

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

Генералов И.И.

**АБЗИМНАЯ АКТИВНОСТЬ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ**



Витебск, 2000

УДК 616-097-5

Генералов И.И. АБЗИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИ-
НОВ. Витебск, 2000. – 152 с.

ГЗ4

Исследованиями последних лет показано, что антитела могут проявлять собственную каталитическую (абзимную) активность. Получены первые моноклональные и генно-инженерные препараты каталитических иммуноглобулинов, пригодные для промышленного и медицинского применения. Также доказано, что в условиях обычного иммунного ответа могут возникать абзимы, способные ускорять реакции гидролиза, фосфорилирования, окислительно-восстановительные и некоторые другие. Наиболее часто продукция таких антител отмечается при аутоиммунных состояниях. В монографии приведены данные, касающиеся взаимосвязи абзимной активности иммуноглобулинов с клиническими проявлениями аутоиммунных, вирусных и онкологических заболеваний. Обсуждается их роль в возникновении и развитии патологических процессов.

Для иммунологов, патофизиологов, биохимиков, врачей, а также студентов и аспирантов медицинских и биологических специальностей.

298153 № 2000

Рецензенты:

заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии
ВГМУ, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН Д.К.Новиков;
профессор кафедры инфекционных болезней ВГМУ, доктор медицин-
ских наук М.Л.Доценко

БИБЛИОТЕКА ВГМУ

Утверждено на заседании профильного учебно-научно-методического
Совета "Микробиология, иммунология и инфекционные болезни" ВГМУ
29.XI.2000 г. (протокол № 7).

Рекомендовано к печати Центральным учебно-научно-методическим
Советом ВГМУ, протокол №9 от 18.XII.2000г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	3
ПРЕДИСЛОВИЕ	5
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ОСОБЕННОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ И ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АБЗИМНОГО КАТАЛИЗА	11
МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА	15
МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИНДУКЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АТ	15
ТИПЫ И МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗИРУЕМЫХ РЕАКЦИЙ	22
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АБЗИМОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ.....	27
ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА	34
МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ	34
ОЦЕНКА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ	42
<i>Протеолитическая активность иммуноглобулинов</i>	<i>43</i>
<i>Иммуноглобулины, проявляющие оксидоредуктазную активность</i>	<i>47</i>
<i>Нуклеазная активность антител</i>	<i>48</i>
<i>Некоторые другие виды абзимной активности поликлональных иммуноглобулинов</i>	<i>58</i>

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ С ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ И ОЦЕНКА ИХ ВЛИЯНИЯ НА АБЗИМНУЮ АКТИВНОСТЬ	63
ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ПОЯВЛЕНИЯ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТЬЮ	73
ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В КАЧЕСТВЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ	83
АБЗИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ	89
ПРИЧИНЫ ПОЯВЛЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АТ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ	94
АНАЛИЗ СВЯЗИ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ С ПРОЯВЛЕНИЯМИ ЗАБОЛЕВАНИЙ	96
РОЛЬ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ	102
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	107
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	129

*Моему учителю
Константину Семеновичу Азаренку
посвящается*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Кафедра микробиологии, иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета в течение уже более чем 10 лет проводит исследования каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов, появляющихся в как в норме, так и при патологических состояниях.

За это время наука о каталитических антителах – абзимология – прошла путь от первых лабораторных экспериментов до промышленного получения каталитических антител ведущими мировыми компаниями, от открытия абзимно активных иммуноглобулинов *in vivo* до понимания механизмов их действия, от выявления каталитических антител при аутоиммунных и других патологических процессах до их использования для диагностики, профилактики и лечения заболеваний. Работа в этой области существенно стимулировала исследования, проводимые не только в иммунологии, но и в молекулярной биологии в целом (проблемы кинетики и биокатализа, биотехнологии, изучение молекулярной эволюции).

Настоящая работа представляет собой попытку первого отечественного обобщения данных, полученных при изучении абзимного катализа. Она может быть полезной для иммунологов, патофизиологов, биохимиков и клиницистов.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АИТ – аутоиммунный тиреоидит;
АТ – антитело (антитела);
АГ – антиген (антигены);
БА – бронхиальная астма;
БАПНА – бензоил-аргинин-р-нитроанилида гидрохлорид;
ВГВ – вирусный гепатит В;
ВГС – вирусный гепатит С;
ВИП – вазоактивный интестинальный полипептид;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
ГК – гиалуроновая кислота;
ГКС – глюкокортикостероиды;
ДБСТ – диффузные болезни соединительной ткани;
ДНКазы – дезоксирибонуклеазы;
ДДС-Na – додецилсульфат Na;
ЕОП – единицы оптической плотности;
ИГ – иммуноглобулин (иммуноглобулины);
МХХ – металло-хелатная хроматография;
Me – металл (катионы металла);
ПАГ – полиакриламидный гель;
РА – ревматоидный артрит;
САПС – стабильный аналог переходного состояния (субстрата);
СКВ – системная красная волчанка;
УЕ – условные единицы;
ФОВ – фосфорорганические вещества;
Ig – иммуноглобулины;
IgG – иммуноглобулины класса G;
IgA – иммуноглобулины класса A;
IgM – иммуноглобулины класса M

The history of this field illustrates the dangers of assuming that novel observations must fit into the simple confines of established theories

Paul S. "Autoantibody catalysis: no longer hostage to Occam's razor"

ВВЕДЕНИЕ

Изучение антител (АТ), проявляющих каталитическую активность, представляет собой новое направление, возникшее в последние годы развития иммунологии [284]. Количество исследований, посвященных данной проблеме, быстро нарастает. Это представляется закономерным, так как их результаты не только позволяют успешно решать многие биотехнологические задачи [112, 124, 125], но и дают возможность по-новому оценить сам процесс становления и развития иммунного ответа. Кроме того, несомненно, что данное явление имеет и важное общебиологическое значение. Оказалось, что одна и та же молекула антитела способна как связывать лиганд-антиген, выступая в роли рецептора, так и превращать его, выполняя энзимную функцию [282; 283, 318]. Такие каталитически активные иммуноглобулины были названы *абзимами* ("abzymes", от англ. – *antibody+enzyme*).

К середине 90-х годов уже прояснились многие закономерности абзимного катализа [147, 157]. Также были разработаны основные экспериментальные подходы к получению каталитических иммуноглобулинов (ИГ), изучены особенности очистки препаратов АТ и тестирования их на специфическую активность, исследованы причины появления каталитически активных антител, механизмы их абзимного действия, типы катализируемых реакций, возможность усиления абзимной активности под влиянием кофакторов. Кроме того, к настоящему времени проверена возможность энзимного действия АТ на все основные классы субстратов [284]. Проведенные в

этой области исследования показали, что не существует принципиального запрета на создание самых разнообразных антительных биокатализаторов [83, 131, 246]. Это подтверждается и тем фактом, что получены абзимы, ускоряющие реакции, не имеющие в природных условиях соответствующих ферментов [284].

В свою очередь, результаты, полученные с применением моноклональных АТ, послужили основой для изучения каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов. Учитывая, что при разворачивании иммунного ответа в живом организме появляется широкий спектр АТ с различной аффинностью [11, 31], возникла очевидная необходимость оценить каталитическую функцию поликлональных АТ, образующихся *in vivo*. Их обнаружение представлялось особенно вероятным в ходе процессов иммунизации, а также при аутоиммунных заболеваниях [158].

Безусловно, что изучение каждой вновь открытой функции иммуноглобулиновой молекулы является важным не только в теоретическом отношении, но представляет несомненный практический интерес.

Многочисленные результаты экспериментальных и клинических исследований, проведенных в последние годы, убедительно доказывают, что иммунологический компонент присущ большинству заболеваний [50]. Иногда он первичен, в некоторых случаях иммунные механизмы включаются в процессе развития болезни. Традиционно считается, что основными повреждающими факторами в иммунопатологии являются образование комплексов "антиген-антитело" с активацией системы комплемента по классическому и альтернативному путям, цитотоксическое действие лимфоцитов на клетки-мишени, усиление синтеза провоспалительных цитокинов лимфоцитами и макрофагами [64, 86, 137, 143] и т.д. Многие из этих реакций зависят от взаимодействия образующихся в ходе иммунного ответа антител с комплементарным лигандом-антигеном [86].

Приблизительно с середины 70-х годов происходило постепенное накопление данных, дополняющих уже известные сведения о биологических функциях антител и иммуноглобулинов. В частности, оказалось, что если в роли антигена выступает биологически активное соединение (гормон, нейротрансмиттер, транспортный белок или фермент [192, 193, 211, 275]), то в организме возникает широкий спектр биохимических и физиологических превращений, вызываемых антителами. Они оказались способными вмешиваться в

лиганд-рецепторные взаимодействия любой природы, причем могли как усиливать, так и ингибировать их [6, 8, 152, 302].

Также было выявлено, что в динамике иммунного ответа могут возникать антитела, обладающие по крайней мере частью биологических функций антигена – индуктора иммунного ответа. В частности, такими свойствами обладают антиидиотипические антитела, несущие “внутренний образ” молекулы антигена [109, 132, 144].

Наконец, было показано, что при образовании комплекса АГ-АТ происходит изменение конформации молекулы АТ [11]. Это увеличивает вероятность связывания молекулой иммуноглобулина другого лиганда или может привести к образованию в молекуле каталитического центра.

Эти и многие другие результаты доказали, что иммуноглобулины, помимо “традиционного” участия в связывании и элиминации АГ, выполняют большое количество других регуляторных функций [2, 4]. Учитывая громадное разнообразие иммуноглобулиновых молекул, а также длительный период их полураспада (в первую очередь молекул IgG), Ашмарин И.П. и Фрейдлин И.С. предложили рассматривать АТ как биологические регуляторы сверхдлительного действия (молекулы-”информоны”) для тонкой модуляции гомеостатических процессов [9]. Кроме того, вмешательство иммуноглобулинов в лиганд-рецепторные взаимодействия любой природы во многих случаях является причиной возникновения и развития самых различных патологических состояний [50, 51, 133]. Обнаружение каталитической функции некоторой части иммуноглобулиновых молекул существенно расширяет их патогенетический потенциал [24].

Дальнейшее изучение этих процессов приведет к более полному пониманию патогенеза аутоиммунных расстройств и, возможно, даст ключ к их дифференциальной диагностике.

Последнее положение представляется весьма существенным с клинической точки зрения, поскольку “...болезни, недавно казавшиеся мономорфными, оказались не только клинически вариабельными, но многие из них распались на синдромно сходные, но нозологически обособленные формы, которые различаются в одних случаях по этиологии, в других – по патогенезу и – что самое главное – требуют принципиально разных лечебных подходов” [85].

Изучение каталитически активных АТ создает возможности для поиска новых диагностических методов.

В свою очередь, не менее важным с практической точки зрения представляется использование абзимных иммуноглобулинов как новых иммунотерапевтических препаратов.

Таким образом, к настоящему времени в современной абзимологии сформировались 2 главных направления исследований. Первое из них образовалось на стыке химии и иммунологии и преследует своей целью получение новых высокоэффективных биокатализаторов для решения самого широкого круга химических и биологических задач. В рамках этого направления были исследованы основные механизмы действия абзимных катализаторов.

Другое направление связано с изучением функции и роли абзимов в развитии реального иммунного ответа. В клиническом отношении наиболее важным аспектом данной проблемы является исследование взаимосвязи абзимной активности с патогенезом и клиническими проявлениями заболеваний, их лечением и возможным прогнозом.

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ И ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АБЗИМНОГО КАТАЛИЗА

Еще со времен Л.Полинга отмечалось поразительное сходство между уникальной специфичностью антител и ферментов [282, 308]. Однако было принято считать, что АТ способны к прочному связыванию лигандов, лишь находящихся в стабильном состоянии. Ферменты же, в свою очередь, обладают способностью фиксации нестабильного переходного состояния, возникающего при катализе биомолекул. Такое положение подчеркивало различие в механизме действия АТ и ферментов [11, 31].

Отсюда сложилось мнение, что результатом взаимодействия антигена с антителом является лишь образование иммунного комплекса за счет нековалентных связей [94]. В свою очередь, результатом взаимодействия фермента с субстратом является образование или разрыв связи в субстрате [32].

Было доказано, что превращение субстрата в продукт происходит через стадию нестабильного короткоживущего переходного состояния, причем свободная энергия активации такого переходного состояния в присутствии энзима существенно ниже, чем в отсутствие катализатора. На свободную энергию субстрата или продукта энзим не влияет. Тем самым снижается энергетический порог реакции, и значительно увеличивается вероятность превращения субстрата в продукт под действием фермента (рис.1).

Исследователи, работавшие в области биохимии энзимов, добились значительных успехов в понимании процессов, протекающих при ферментативном катализе [12, 49, 52]. В частности, были определены возможные способы ферментативного катализа энзимов. Они являются следующими (цит. по W.P.Jenks): "... существуют четыре механизма, по которым энергия связывания может быть использована для ускорения реакции в фермент-субстратном комплексе — 1) "индуцированное соответствие", 2) дестабилизация субстрата 3) продуктивное связывание, 4) уменьшение энтропии". Все они основаны на использовании энергии специфического взаимодействия при помещении субстрата в связывающий сайт для трансформации его формы или структуры [216].

Рис. 1. Ускорение химической реакции под действием фермента через стадию переходного состояния

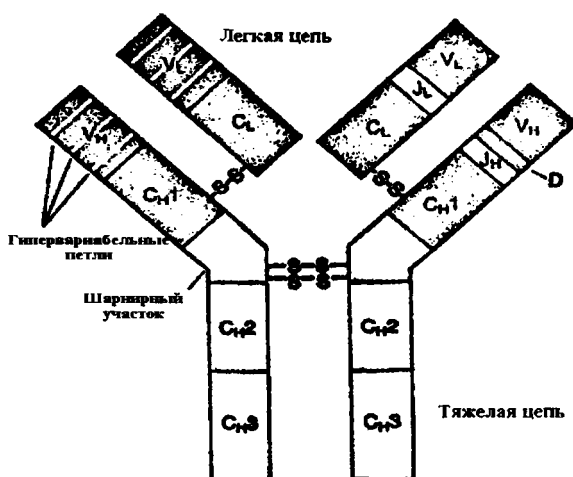


С другой стороны, результатом обширных иммунологических исследований явились определение структуры молекулы иммуноглобулина (рис.2), понимание механизмов специфического связывания между АТ и комплементарным АГ, а также раскрытие причин громадного разнообразия антигенсвязывающих участков иммуноглобулинов.

Оказалось, что каждая тяжелая и легкая цепь иммуноглобулина кодируется несколькими генными фрагментами, расположенными на разных хромосомах [61]. В ДНК половых клеток они разобщены и объединяются непосредственно в В-лимфоцитах и плазматических клетках. При объединении фрагментов генома в единую последовательность ДНК происходят множественные рекомбинации и мутации (делеции, инверсии, дупликации) в области соединения сегментов. Это приводит к прогрессивному нарастанию возможных вариантов [86]. Разнообразие антител увеличивается и при последовательной смене (переключении) классов иммуноглобулинов (с IgM и IgD на IgG, IgA и т.д.), продуцируемых одной клеткой [61]. И наконец, разнообразие вариантов иммуноглобулинов продолжает постоянно увеличиваться и после непосредственных контактов иммунной системы с антигеном. Это связано с наличием генетического механизма, обуславливающего постоянные соматические мутации в последовательности ДНК уже сформированных антител.

Общее разнообразие иммуноглобулинов достигает таким образом миллиардов вариантов [61].

Рис. 2. Структура молекулы иммуноглобулина



Гиперварибельные петли формируют районы, определяющие комплементарность молекулы ИГ (CDR);

V_L и D_L , V_H , D_H и J_H - сегменты генов, кодирующие переменные участки легких и тяжелых цепей, соответственно

Кроме того, были определены основные закономерности связывания АТ с комплементарным ему АГ. Выяснилось, что антитела связывают молекулы размером от 6 до 34 ангстрем с константой ассоциации от 10^{-4} до 10^{-14} М. Рентгеноструктурный анализ показал, что небольшие АГ связываются непосредственно в АГ-связывающемся кармане, более крупные молекулы могут связываться на протяженном пространстве в 600-800 кв.ангстрем [283]. Молекулы воды исключаются из взаимодействующих поверхностей и связывание осуществляется Ван-дер-Ваальсовыми силами, силами гидрофобного и электростатического взаимодействия, а также водородными связями [172].

В целом энергия взаимодействия АТ и АГ невелика. Даже очень высокоаффинным АТ соответствует энергия, эквивалентная приблизительно образованию лишь 3 водородных связей. Небольшое из-

менение энергии связывания (около 1,42 ккал/моль при 37°C) приводит к увеличению константы связывания АТ в 10 раз. Из многих типов взаимодействий (гидрофобных, ионных, водородных связей), возникающих между контактирующими участками антигена и АТ, почти столько же отталкивающих, сколько и притягивающих. Поэтому очевидно, что весьма небольшие модификации антигена могут приводить к очень большим изменениям сродства. Единственная водородная связь способна изменить аффинность во много раз. Это справедливо и в отношении гидрофобного и других взаимодействий [11].

Таким образом, многочисленными исследованиями было подтверждено, что механизмы связывания как фермента с субстратом, так и АТ с АГ являются весьма сходными, а в определенных условиях – практически идентичными.

В качестве иллюстрации здесь можно привести вступление к главе “Взаимодействие антиген-антитело” (авторы – J.A.Berzofsky и I.J.Berkower), опубликованной в руководстве по иммунологии под редакцией W.E.Paul (1984-1989 гг., [11]): “В основе взаимодействия антигена с антителом лежат те же принципы, что и в основе любой бимолекулярной реакции. Более того, связывание антигена с антителом в целом может быть описано в рамках тех же теорий и изучено с помощью тех же экспериментальных подходов, как и связывание гормона с рецептором, субстрата с ферментом или кислорода с гемоглобином... Следовательно, взаимодействие антитела с антигеном может рассматриваться как пример взаимодействия макромолекул с лигандами вообще благодаря наличию у антител таких особенностей, как обратимость связывания и большое разнообразие специфичностей...”

Из вышеизложенного прямо следует, что IgG, в первую очередь из-за своей гетерогенности, могут в определенных случаях взаимодействовать и с рецептором (выступая в роли своеобразного гормона), и в роли фермента, взаимодействующего с субстратом, причем такие взаимодействия могут быть самыми разнообразными.

Однако далее эти же авторы утверждают, что принципиальным отличием взаимодействия АТ и АГ является невозможность необратимых изменений как антитела, так и антигена [11].

Последнее утверждение подверглось пересмотру буквально через 1-2 года. Уже в 1985-1986 годах появились первые публикации и патенты, посвященные каталитическим антителам [76].

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИНДУКЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АТ

Принято считать, что первыми работами, посвященными данной проблеме, являются исследования [263, 308], опубликованные в журнале "Science" в декабре 1986 года. Их результаты также нашли свое воплощение в способе получения каталитически активных молекул с антительными центрами, который был запатентован ранее [254].

Тем не менее, сами авторы этих исследований упоминают ряд работ, где уже предпринимались попытки получения ферментативно активных АТ. Существуют и другие указания на подобные исследования. В одних случаях это были целенаправленные усилия, в других – случайные находки.

Так, в 1966 г. Slobin I.I. обнаружил ускорение гидролиза р-нитрофенилацетата под действием как иммунных, так и нормальных ИГ [291]. Взаимодействие в данном случае подчинялось кинетике реакции 2-го порядка.

В 1968-1969 г. А.Я. Кульберг с соавт. [70, 71] открыли способность иммуноглобулинов кролика к спонтанному гидролизу при кислом значении рН. Этим свойством обладали и аффинно очищенные на антигене АТ. Они не содержали примесей плазмина и калликреина.

В 1975 г. Raso V. и Stollar B.D. попытались направленно создать ферментативно активные АТ, применив иммунизацию кроликов стабильным аналогом переходного состояния в реакции переаминирования тирозина. Для этого использовали N-(5-фосфопиридоксил)-3-амино-L-тирозин, напоминающий шиффово основание переходного комплекса. Авторам удалось получить, однако, лишь пятикратное ускорение реакции, удлинив при этом время инкубации до 300 часов [272, 273].

В 1977 г. Burd J.F. с соавт. обнаружили ускорение гидролиза синтетического конъюгата моно-(ДНФ-капроил)-флюоресцеина под действием соответствующих АТ. Следует отметить, что эти же АТ

успешно ингибировали распад этого субстрата специфической эстеразой [295].

В 1980 г. группой Kohen F. et al. было выявлено свойство антител к тестостерону вызывать гидролиз его синтетического флюоресцентного аналога тестостерон-карбоксиэтилтиозфира умбеллиферона. АТ обладали субстратной специфичностью, не гидролизуя близкие к исходному по структуре конъюгаты. Тем не менее, число оборота таких АТ-энзимов оставалось невысоким [129].

Кроме того, в большом количестве исследований было изучено влияние антител на обычные ферментативные реакции. В основном АТ ингибировали активность ферментов. 100% ингибиции зарегистрировано для пенициллиназы, карбоксилазы дрожжей, тирозиназы, гиалуронидазы, триптофаназы, липазы, ДНКазы, желатиназы и многих других ферментов [41]. Однако в некоторой части работ отмечена достаточная активация энзимов под влиянием АТ. Так, Cinader B. в своей монографии указывает на активацию рибонуклеазы, а также пенициллиназы штамма 749 *B. licheniformis* [122]. Аналогичное явление отмечалось и для каталазной реакции в работе Шатаевой Л.К. с соавт., причем оптимум активации смещался в сторону более высоких температур в сравнении с немодифицированной реакцией [103]. Тогда же Ullman E.F с соавт. показали, что иммунные АТ к тироксину способны на 70% усиливать действие фермента малатдегидрогеназы, конъюгированной предварительно с самим тироксином [205].

Препараты поликлональных АТ проявляли каталитическую активность и в составе иммунных комплексов. Здесь следует отметить работы А.К.Адамова с соавт. [1], описавших образование так называемых иммунных циклов – комплексов, состоящих из фермента, специфического АТ и соответствующего АГ. Активность ферментов (лизоцима, фосфоглюкомутазы, ксантиноксидазы) в составе таких комплексов могла как усиливаться, так и ослабляться в зависимости от количественного соотношения ингредиентов, входящих в цикл.

Основные трудности большинства вышеперечисленных экспериментальных систем, безусловно, были связаны с гетерогенностью изучаемых поликлональных АТ.

Положение изменилось с созданием гибридомной технологии. С ее развитием открылась возможность исследовать действие моноклональных АТ (мАТ) на ферментативную реакцию.

Развернутое изучение взаимодействия МАТ с ферментами было проведено в 1980 г. группой Р.Фракелтона (Frackelton R.) из Массачусетского технологического института. Они проанализировали продукты более чем 300 гибридом, полученных к бета-галактозидазе кишечной палочки [191]. Оказалось, что энзим вызывает образование по крайней мере 4 функционально различных типов моноклональных АТ: активирующих, инактивирующих, протективных (защищающих от тепловой инактивации) и нулевых (безразличных). Распределялись они следующим образом: приблизительно 4,2% инактивирующих, 50,7% – активирующих, нулевые составляли около 24%. 2 культуры продуцировали моноклональные АТ, несущие одновременно 2 функции – активирующую и протективную.

Это исследование также свидетельствует в пользу того, что целенаправленный поиск путей генерации АТ с собственной энзимной активностью для биологических целей значительно облегчается при использовании гибридомной техники. Моноклональные АТ могут быть получены в количестве, достаточном для регистрации энзимной реакции практически любым известным способом.

Именно с помощью моноклональных антител были предложены основные методы генерации абзимов, изучены особенности очистки препаратов АТ и тестирования их на специфическую активность. Кроме того, к настоящему времени с их помощью проверена возможность энзимного действия АТ на все основные виды субстратов [233, 325]. Полученные результаты прояснили многие закономерности, присущие не только антительному катализу, но и ферментативному катализу в целом [232]. С другой стороны, полученные данные являются основой для понимания функционирования поликлональных каталитических АТ в условиях *in vivo* после индукции иммунного ответа или возникновения аутоиммунного процесса.

Первый подход к дизайну каталитических антител был основан на следующем: моноклональные АТ вырабатываются не к субстрату непосредственно, а к стабильному аналогу его переходного состояния (САПС). Тем самым они смогут стабилизировать переходное состояние и увеличить вероятность превращения субстрата. Основная идея подобного механизма принадлежала еще Л.Полингу (Pauling L.) [263, 308]. Одна группа исследователей успешно осуществила гидролиз карбоксильных эфиров полученными моноклональными антителами, а другая – использовала широко известные МАТ

класса IgA МОРС 167 для специфического гидролиза некоторых карбонатов. Последняя группа применила данные антитела, учитывая их известную способность к связыванию в качестве АГ нитрофенилфосфорилхолина. Он и послужил стабильным аналогом переходного состояния для р-нитрофенил-N-триметиламмонийэтилкарбонатхлорида – непосредственного субстрата катализа [263].

Было достигнуто ускорение реакции до 960 раз по сравнению со спонтанным гидролизом субстрата [263, 308]. Исследователи заявили, что эти работы открывают новый путь в осуществлении биотехнологических процессов [235]. По аналогии с ферментами авторы назвали полученные каталитические антитела абзимами (antibody + enzyme). Предлагаемый исследователями способ дизайна абзимов может считаться достаточно универсальным. Тем не менее, сами авторы считают, что он может быть с успехом дополнен другими методами, например – введением кофакторов в активные центры АТ [308], что впоследствии полностью подтвердилось (см. ниже).

Другой подход, описывающий возникновение каталитических АТ *in vivo* и возможность их генерации *in vitro*, был предложен нами в 1987 г. Он был основан на антиидиотипическом механизме. Подобный способ хорошо объяснял появление АТ-ферментов в ответ на факторы агрессии и инвазии микробов. В частности, нами были описаны АТ, способные ускорять гидролиз гиалуроновой кислоты [42, 68].

Данный метод нашел свое подтверждение и в экспериментальных системах. В 1988 году А.Я.Кульберг и И.М.Петяев продемонстрировали, что поликлональные антитела, особенно – в присутствии специфического АГ или антиидиотипических АТ, способны генерировать супероксиддисмутазную активность [57, 58].

Аналогично, используя ацетилхолинэстеразу в качестве первичного иммуногена, Izadyar L. с соавт. получили высокоэффективное каталитическое антитело также по антиидиотипическому механизму. Авторы считают, что данный идиотип оказался “внутренним образом” активного центра фермента холинэстеразы. Такие же подходы были реализованы в работах Avalle B. с соавт. [138, 139, 140].

Третий из имеющихся способов – это введение в активные центры ИГ новых аминокислот с каталитически активными группами (серин, гистидин, триптофан, тирозин и т.д.). Он может быть осуществлен при помощи сайт-специфического мутагенеза в активных центрах АТ. Так, в частности, Hilyard K.L. с соавт. проанализиро-

вали структуру природных аспаргат-протеаз и, следуя этому, заменили Тир32 в легкой цепи моноклонального IgG последовательно на фенилаланин, серин и аспарагин, получив эффективное каталитическое антитело. Авторы пришли к заключению, что подобный способ генерации абзимов является наиболее перспективным [268].

Дальнейшее развитие эти идеи получили в работах E. Baldwin и P.G. Schultz. Был создан гибридный Fv-фрагмент динитрофенилсвязывающего IgA MOPC315, состоящий из V-доменов рекомбинантной легкой цепи и тяжелой цепи, полученной непосредственно из антитела. Тир34 VL-домена был замещен на гистидин для введения каталитической имидазольной нуклеофильной группы в активный центр. Мутантный по гистидину Fv-фрагмент ускорял гидролиз 7-гидроксикумаринового эфира в 90 тыс. раз. Авторы делают вывод о важности даже единственной аминокислотной замены в активном центре для индукции каталитической активности [142].

Следующий способ, используемый в дизайне абзимов, основан на механизме уменьшения энтропии взаимодействующих реагентов. АТ в этом случае снижают хаотические колебания реагирующих атомов и групп. Подобный подход наиболее приемлем для катализа внутримолекулярных реакций. Так, D.Y. Jackson с соавт. осуществили получение каталитически активных АТ, основываясь на их способности вызывать эффект сближения реагирующих группировок [118]. В данном примере абзимы выполняли мономолекулярную реакцию (перегруппировку Кляйзена).

Еще одним эффективным способом генерации каталитических АТ является метод, основанный на получении АТ к гаптену, обладающему заряженной химической группировкой [106]. В этом случае продуцируются ИГ, несущие в активном центре противоположный заряд.

При помощи такого подхода исследователи [282] получили 6 МАТ, 5 из которых катализировали реакцию фотохимического расщепления димеров тимина.

Дальнейшее развитие этот подход получил в работах группы Janda K.D. [210], которые использовали его для ускорения реакций ацильного переноса. Для этого в САПС в максимальной близости или непосредственно вместо трансформируемой группировки вводится заряженная группа. В результате иммунизации в активном центре абзима появляется противоположный заряд. Отсюда, поми-

мо стабилизации переходного состояния субстрата, мАТ приобретает способность к общему кислотно-основному катализу.

Lerner R.A. с соавт. предложили еще один способ индукции каталитических клонов [231]. До настоящего времени считалось, что селекция и пролиферация иммунных клеток происходят за счет нековалентного взаимодействия АГ с комплементарным рецептором или АТ. Авторы предположили, что ковалентное их взаимодействие, с учетом прочности образовавшегося комплекса, может быть не менее эффективным селективным индуктором иммунного ответа. Такой подход получил название “реагирующей” иммунизации (“reactive immunisation”). Реакционноспособные иммуногены химически реагируют с активными центрами АТ и рецепторов. Это позволяет прямо активировать клоны, содержащие в активных центрах необходимые аминокислоты. В частности, используя в качестве иммуногена 1,3-дикетон можно активировать клоны, несущие лизин в активных центрах.

Аналогично при использовании фосфорорганических гаптенон в антигенсвязывающих сайтах происходит химическая реакция с образованием фосфонилированного промежуточного соединения. Это позволяет активировать большинство, если не все, реакционноспособные клоны [319].

С помощью данного подхода были получены каталитические мАТ с альдолазной активностью [219].

Наконец, еще одним, возможно – наиболее естественным, способом получения энзимно активных АТ является прямое введение в активный центр антитела катионов металлов (Me), нуклеофильных и электрофильных групп, кофакторов ферментов [305]. Здесь необходимо остановиться подробнее, так как в реальных условиях поликлонального иммунного ответа образовавшееся антитело-абзим постоянно взаимодействует с разными молекулами, которые могут выступать в роли кофакторов ферментативных реакций. В первую очередь здесь необходимо отметить катионы металлов как наиболее вероятных индукторов энзимного действия. В частности, для организации активного центра некоторым ферментам организма (например, ДНКазе) требуются катионы Mg^{+2} . Без катиона фермент неактивен [102].

Исследования на моноклональных АТ подтвердили подобную возможность.

Iverson B.L. с соавт. [241] сконструировали АТ, копирующее своим активным центром координационный сайт связывания Zn (II) карбоангидразы В. Это достигалось путем генно-инженерного введения в легкую цепь АТ трех остатков гистидина. О способности такой молекулы связывать цинк судили по металлозависимому гашению флюоресценции. Такое “металлоантитело” оказалось способным катализировать окислительно-восстановительные и гидролитические реакции.

A.G.Cohran и P.G.Schultz [167] получили каталитические мАТ, способные вводить в мезопорфирин IX ионы металлов. Абзимы ускоряли хелатообразование с такими катионами, как Zn (II) и Cu (II). Медленнее в эту реакцию вступали Co (II) и Mn (II). Никель не хелатировался. Иммунизация была проведена N-метил-протопорфирином IX – мощным ингибитором феррохелатазы – терминального фермента цепи биосинтеза гема.

Китайскими исследователям (Luo G. с соавт.) путем химического мутагенеза удалось получить селен-содержащее моноклональное АТ, катализирующее окислительно-восстановительные реакции. Полученные мАТ с пероксидазоподобной активностью были впоследствии охарактеризованы по всем кинетическим параметрам [205].

Группа исследователей из института им.Баха РАН получили моноклональные АТ к палладиевым копропорфиринам. Авторы получили 23 гибридомы, 16 из которых продуцировали мАТ класса IgM и 7 – класса IgG. Связывание мАТ с копропорфирином без металла было в 10 раз слабее, чем с Pd-содержащим копропорфирином. Далее авторы изучили пероксидазоподобную активность комплекса мАТ с Fe(III)-копропорфирином с орто-дианизидином в качестве субстрата. Каталитическая константа реакции была в 1000 раз ниже, чем у нативной пероксидазы хрена, тогда как pH-зависимость и константа связывания оказались сходными [243].

Наличие металла в активном центре абзима делает возможным селективное извлечение таких антител из реакционной смеси [269]. В работе [145] металлосвязывающие ИГ из полусинтетической рекомбинантной библиотеки прямо извлекали при помощи металлоаффинной хроматографии или магнитной сепарации на магнетите. Аналогично Roberts V. с соавт. [126, 276] сконструировали химерные каталитические АТ, в которых одна из цепей связывала кофактор (например – ион металла (Zn), а другая связывала соответству-

ющий субстрат. Путем сайт-направленного мутагенеза удалось поместить цинк в глубину антиген-связывающего кармана АТ. Впоследствии полученные Fv-фрагменты клонировались в *E.coli*.

Вышеприведенные и другие [220] исследования показывают перспективность дальнейшего изучения взаимодействия антител и катионов металлов с последующей оценкой их абзимной активности.

Примыкает к этим исследованиям работа Pollack S.J. с соавт. [264]. Они предложили общий метод введения в активный центр АТ каталитически активных центров, используя конъюгат специфического АГ с альдегидом или бромкетонем через дисульфидную или тиофенильную связь. В последующем связь восстанавливалась дитиотрептолом с образованием активной тиольной группы. Этим достигались 2 основные цели: во-первых, АТ приобретали способность к катализу посредством введенного нуклеофила и, во-вторых, их можно было выделять, используя обратимое связывание по тиолу. Полученные абзимы гидролизovali кумариновые эфиры с ускорением до 60000 раз.

В полученных результатах обращает на себя внимание то обстоятельство, что каталитической группой в данной реакции является тиол. Не исключено, что и в поликлональных ИГ восстановленные сульфгидрильные группы могут ускорять определенные типы химических реакций. Наличие таких групп в молекуле поликлональных IgG показано в работе [226].

ТИПЫ И МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗИРУЕМЫХ РЕАКЦИЙ

Помимо разработки способов генерации каталитических АТ, внимание исследователей фокусируется на механизме их действия.

Оказалось, что АТ действуют по механизмам, во многом присущим истинным ферментам. Типы реакций, катализируемых абзимами, также многообразны и во многом уникальны [252]. Было обнаружено, что АТ могут катализировать реакции, не имеющие в природе соответствующих ферментов.

Это можно проиллюстрировать многими примерами.

Janda K.D. et. al. [210] получили антитела, которые могли катализировать весьма энергозависимые реакции, в частности – гидролиз амидной связи. Ускорение реакции составило 250 тыс. раз.

Реакция успешно специфически ингибировалась. Кроме этого, авторы пришли к заключению, что в данном случае катализ обусловлен и кислотно-основным механизмом, помимо стабилизации переходного состояния. По мнению авторов, данная работа открывает возможности для продукции абзимов-протеаз.

Это было подтверждено Iverson B.L. и Lerner R.A. [212], которые получили абзимы, вызывающие гидролиз пептидов согласно их аминокислотной последовательности.

В другой работе были созданы АТ, обладающие липазной активностью, причем они селективно распознавали R и S энантиомеры субстрата. Из 18 первоначально отобранных АТ 11 обладали каталитической активностью в отношении рацемической смеси: 9 действовали на R-форму, 2 – на S-форму рацемата. Примечательно, что стереоселективность АТ сохранялась даже при снижении доли катализируемого энантиомера в смеси менее, чем до 2% [214].

Еще одни абзимы, способные проводить стереоселективный катализ, были получены в Калифорнийском университете в Беркли [146]. До сих пор в биохимии существовало сравнительно немного ферментов, осуществляющих хиральный синтез, причем в присутствии дорогостоящих трудно регенерируемых кофакторов. 25% анти-тел против гаптена 4-нитрофенилфосфоната катализировали восстановление кетоамина до альфа-гидроксиламина в присутствии обычного восстановителя цианоборгидрида. 1 из активных МАТ приводило к накоплению одного диастереоизомерного продукта в 99,2% избытке.

Wirsching P. с соавт. [119], используя иммунизацию САПС, получили высокоэффективное каталитическое МАТ, осуществляющее катализ реакции транс-этерификации в водной фазе по пинг-понг-механизму и по механизму индуцированного соответствия с образованием ковалентно связанного с АТ интермедиата. До сих пор считалось, что данные механизмы характерны только для наиболее специализированных ферментов, появляющихся у филогенетически молодых видов. Исследователи объясняют возможность появления таких абзимов огромным разнообразием АТ.

Еще одним убедительным доказательством универсальности абзимного катализа явилась работа Dong Wenling с соавт. [174], где были исследованы МАТ, способные к синтезу углеводов из других органических соединений (в частности – из производных пиперидина).

Durfor C.N. et al. [123], используя иммунизацию САПС, генерировали МАТ, катализирующие гидролиз фенилацетата в обращенных мицеллах, т.е. в неводной фазе. Скорость гидролиза была сопоставима с таковой в водной среде. Из 13 полученных моноклональных АТ 5 (38%) обладали каталитической активностью, т.е. выход абзимов после иммунизации был достаточно высоким.

Другая весьма важная реакция, катализируемая ИГ, была изучена Gouverneur V.E. с соавт. [169]. Речь идет о реакции Дильса-Альдера, не имеющей природных катализаторов, но широко используемой в синтетической химии. Существуют экзо- и эндопути протекания данной реакции (первый – энергетически выгодный, второй имеет высокую энергию активации), причем в первом случае продуктом является чистый цис-энантиомер, в другом – транс-энантиомер. Авторами был получен гаптен, весьма сходный с переходным состоянием данной реакции. С его помощью были генерированы МАТ, катализирующие оба пути превращения. Авторы приходят к выводу, что энергия активации реакций группы Дильса-Альдера (приблизительно 20 ккал/моль) может быть обеспечена за счет специфического взаимодействия субстрата с АТ.

Также оказалось, что каталитические антитела являются уникальным инструментом для изменения направления химических реакций, особенно в исходно энергетически невыгодную сторону. Исследованиями Janda K.D. с соавторами [213, 215] было продемонстрировано, что при помощи абзимов можно преодолеть пространственные электронные барьеры, возникающие в ходе реакции. В частности удалось осуществить весьма энергетически невыгодное превращение эпокиспиртов в тетрагидропиран. Формально такая реакция противоречит известным правилам Балдвина для реакций замыкания колец в органической химии [179]. Помимо контроля направления реакции, эти же каталитические антитела оказались способными катализировать образование только 1 энантиомера в ходе реакции с получением тем самым стереохимически чистого продукта. Авторы утверждают, что принципы, использованные в данной работе могут быть с успехом применены для катализа других энергетически невыгодных процессов.

Иллюстрацией новых подходов к абзимному катализу стали результаты работы Shabat D. с соавт [124]. Они использовали абзимы для катализа реакций с исходно высоким уровнем свободной

энергии переходного состояния. Для иммунизации были использованы соединения с четвертичными аммониевыми катионами. Авторы осуществили стереоспецифическое превращение энольного эфира в энантиомерно однородный кеталь через стадию образования весьма нестойкого в водной среде оксоуглеродного интермедиата. При обычных условиях он взаимодействует с водой, образуя кетон. Антитела же “извлекали” интермедиат из воды, создавая для него гидрофобное окружение в активном центре. Это дало возможность направить реакцию по “энергетически невыгодному” пути.

Li T. с соавт. утверждают [125], что абзимный катализ решает две основные проблемы: ускорение химических реакций и контроль выхода ее продуктов. Им удалось получить МАТ, эффективно (с 98% выходом) катализирующее превращение ациклического олефинового эфира сульфоновой кислоты в циклический спирт. Подобные катализаторы могут ускорять реакции образования связей “углерод-углерод”, “углерод-гетероатом”. Это создает возможности синтеза полициклических молекул, включая стероиды и гетероциклы.

Gigant B. с соавт. показали, что при иммунизации одним и тем же гаптенем можно получить сходные по величине активности моноклональные абзимы, которые, тем не менее, будут радикально отличаться по механизму реакции – скорость-лимитирующей стадий, каталитическим остаткам, находящимся в активных центрах, спектру превращаемых субстратов и т.д. Это напрямую связано с индивидуальными особенностями каждого клонального иммунного ответа [198].

В исследовании Thorn S.N. с соавт. [284] изучались особенности абзимного катализа, протекающего по общему кислотнo-основному механизму. Подчеркивается, что по этому механизму осуществляется большое количество биохимических превращений, включая реакции элиминирования, изомеризации, рацемизации, гидролиза, а также образования связей углерод-углерод. Основным условием для ускорения подобных реакций является размещение каталитической группировки абзима в подходящее микроокружение. Это может быть с успехом достигнуто при использовании в качестве САПС гаптена с выраженным противоположным зарядом. Авторы использовали для иммунизации катионный гаптен. Полученное в результате иммунизации МАТ содержали в своем активном центре карбоксильные группы и функционировали как высокоэффективный

общеосновный катализатор. Для реакции элиминирования время оборота абзима равнялось 1000 на один активный центр, а общее ускорение реакции составило более 100 млн раз. Последняя работа подтвердила также, что АТ могут катализировать реакции со скоростью, не уступающей самым активным истинным энзимам.

Smithrud D.B. с соавт. [293] были получены каталитические мАТ, обладающие лигазной активностью. С их помощью авторы провели синтез циклического гексапептида d-Trp-Gly-Pal-Pro-Gly-l-Phe из соответствующего эфира. С другой стороны, эти АТ не приводили к гидролизу или эпимеризации субстрата. Наоборот, абзимы значительно снижали спонтанный гидролиз эфирного субстрата. 22-кратное ускорение реакции было достаточным для получения необходимого продукта с выходом более 90%.

Данный результат важен с практической точки зрения, так как подобные гексапептиды представляют собой семейство соединений с многообразными важными в биологическом отношении функциями.

Наконец, не менее значимыми являются и результаты работ Hirschmann R. с соавт. и Smith R.M. с соавт. [202, 292].

В первом исследовании осуществлен абзимный синтез дипептидов. АТ катализировали взаимодействие нитрофениловых эфиров валина, лейцина и фенилаланина с амидом триптофана. Выход дипептидов варьировал от 44 до 94%.

В другом исследовании была предпринята попытка получить АТ с сайт-специфической протеазной активностью. Для этого был разработан новый вариант иммунизации САПС. Стабильными аналогами послужили производные гидроксиэтилена с кольцевидно-напряженными или торсионно-напряженными связями, напоминающими переходное состояние атакующей связи в пептиде. Для того, чтобы гидролиз проходил согласно заданной аминокислотной последовательности, стабильный аналог фланкировали соответствующими аминокислотами.

Значение последних работ трудно переоценить, так как они указывают путь для лабораторного воспроизведения процессов, которые или не имеют аналогов в условиях *in vivo*, или требуют использования сложных клеточных и субклеточных систем.

Вышеприведенные результаты представляют лишь только наиболее яркие примеры действия каталитических АТ. Субстраты и продукты некоторых основных реакций, катализируемых абзимами, приведены в Приложении. В целом полностью отразить все те-

кущее многообразие информации по этому вопросу практически невозможно (только в Интернет представлено несколько сотен источников, посвященных данной проблеме).

В свою очередь, теоретические и экспериментальные исследования, проводимые в абзимологии, уже принесли первые практические результаты: получены моноклональные каталитические АТ, которые все шире начинают применяться для химического синтеза, в биотехнологических процессах и в медицине.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АБЗИМОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ

В настоящее время большинство получаемых каталитических антител является моноклональными. За последние 10 лет это направление бурно развивается [261]. Образовались крупные научно-исследовательские коллективы в составе известных фирм Rhone-Poulenc, Abbot Laboratories, Glaxo, Novartis, Fuji Photo Film, Procter&Gamble Pharmaceuticals, а также много небольших компаний. В частности, в Японии их создано свыше 100. Они интенсивно патентуют различные каталитические антитела [83].

По мнению Webster D.M. [128], абзимы расширили природные пределы использования катализаторов. Tawfik D.S. и Kirby с соавт. [204, 221, 301] более осторожны в оценке перспектив антительного катализа. Авторы считают, что имеющиеся сейчас каталитические ИГ недостаточно эффективно ускоряют реакции, которые можно было бы прямо использовать для биологии и медицины.

Они указывают также на то обстоятельство, что во многих случаях не только антитела, но и многие другие, более простые по строению, белки могут проявлять существенную каталитическую активность, сопоставимую с абзимной. При этом данные авторы исходят из общности строения белковых полипептидных цепей, состоящих из меняющегося набора одних и тех же аминокислот. Функциональные группы последних могут стать центрами катализа в молекуле независимо от природы белка. В своем исследовании [221] они продемонстрировали способность сывороточного альбумина выступать в качестве биокатализатора по крайней мере для некоторых химических реакций. Кинетика таких процессов, сходно с ферментатив-

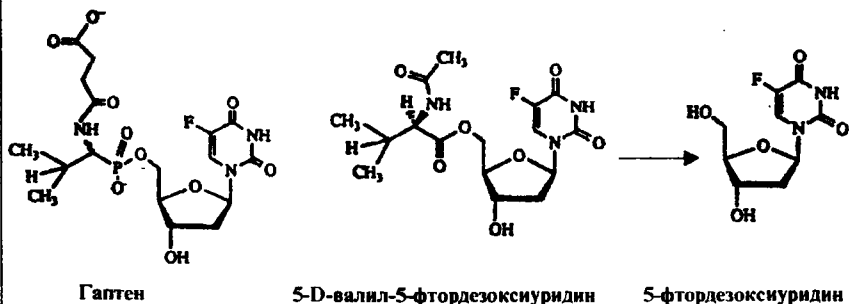
ными реакциями, соответствовала уравнению Михаэлиса-Ментен.

Однако многими примерами подтверждается, что постепенно каталитически активные АТ занимают свое место и в качестве новых реагентов для биосинтетических процессов, и в качестве эффективных иммунотерапевтических средств.

В частности, перспективно использование абзимов для химиотерапии онкологических заболеваний. С их помощью удалось усовершенствовать известную методику активации предшественников цитостатических препаратов непосредственно в ткани опухоли. Это происходит за счет направленного транспорта в опухоль фермента, активирующего цитостатик, антителами к опухолевым антигенам (ADEPT – antibody-directed enzyme prodrug therapy). Входящий в комплекс фермент (обычно бактериального происхождения) может вызывать иммунный ответ в организме больного, что значительно ограничивает применимость метода. В новом способе авторы [307] заменили фермент на абзим (ADAPT-метод), что привело в эксперименте к гибели клеток карциномы толстого кишечника человека вследствие гидролиза предшественника цитостатического препарата с высвобождением его активной формы – азотистого иприта, обладающего выраженной цитотоксичностью.

Аналогично, Campbell D.A. с соавт. получили абзимы, переводящие менее токсичный эфир 5-D-валил-фтордезоксисуридин в его активную цитостатическую форму – 5-фтордезоксисуридин. Для индукции абзимов была использована иммунизация гаптенем – стабильным аналогом переходного состояния (рис.3), конъюгированного с гемоцианином виноградной улитки [155].

Рис.3. Образование активной формы цитостатического препарата 5-D-фтордезоксисуридина в результате абзимного катализа

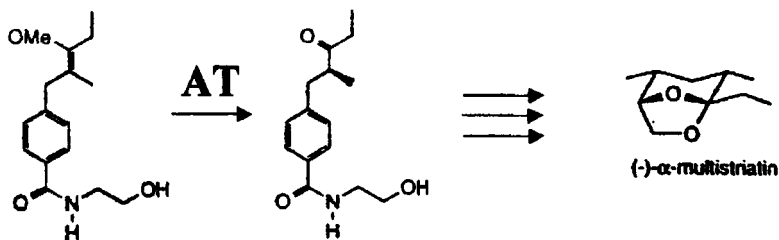


Другим направлением в использовании абзимного катализа является получение биологически активных соединений. Весьма часто органический синтез таких веществ бывает или трудным, или даже невозможным.

В работе S.C.Sinha с соавт. [288] с помощью абзимного катализа был проведен многостадийный синтез α -мультистриатина – основного компонента феромона жука *Scolytus multistriatus*.

Эта реакция является весьма сложной, состоит из 10 стадий, в ней участвуют 4 асимметрических центра. На ключевой стадии синтеза на субстрат действует моноклональное каталитическое антитело (рис. 4), приводящее к стереоселективному протонолизу субстрата – энольного эфира. Данное антитело оказалось не только достаточно активным (ускорение реакции k_{cat}/k_{uncat} составило 65000 раз), но и весьма стереоселективным, причем избыток необходимого энантиомера превышал 95%. Выход конечного продукта реакции составил около 90%.

Рис. 4. Абзимный синтез феромона α -мультистриатина

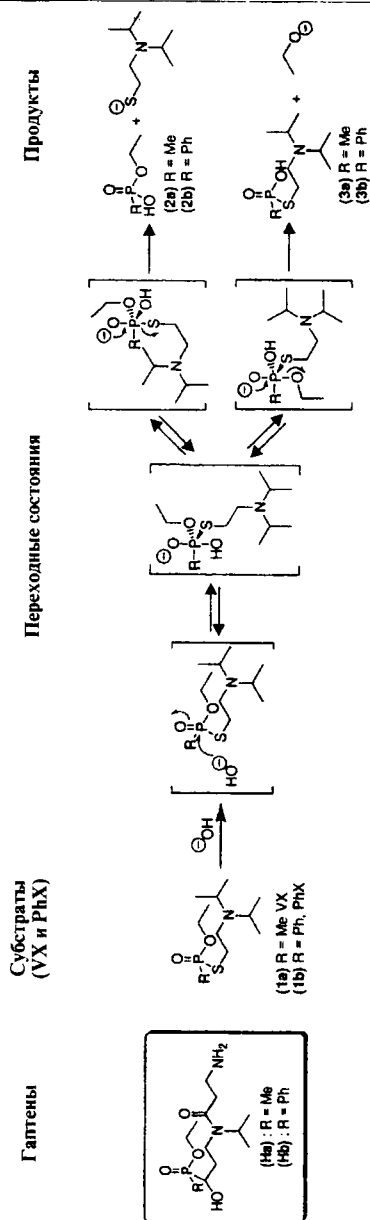


Еще одним важным направлением в практическом использовании абзимов является разрушение ими токсических и наркотических субстанций.

Работами S.Sen с соавт. показана способность каталитических антител вызывать распад трикетон-содержащих гербицидов [285].

Исследованиями Vaygon P. с соавт., 2000 г. [316], было продемонстрировано, что АТ могут стать эффективными агентами, нейтрализующими боевые отравляющие фосфорорганические вещества (ФОВ). В качестве первичного иммуногена был использован гаптен метил- α -гидроксифосфинат (рис.5). Полученные к нему поликлональные каталитические антитела с умеренной скоростью инактиви-

Рис. 5. Ускорение гидролиза VX-агента под действием моноклональных антител



вировали одно из наиболее токсичных (LD_{50} для кроликов при внутривенном введении составляет 8 мкг/кг) боевых отравляющих веществ – метилфосфонотиоат (VX-соединение). Детоксикация данного вида ФОВ является исключительно важной задачей, учитывая гидролитическую стабильность VX-агента в сравнении с другими боевыми ФОВ – табуном, заринном, зоманом.

Поскольку при иммунизации мышей удалось получить лишь небольшое количество анти-VX-антител, уточнить механизм инактивации VX поликлональными антителами (иммунное связывание ФОВ с АТ и/или абзимный катализ VX-агента) авторам не удалось. Отсюда для дальнейших экспериментов были использованы моноклональные АТ, полученные к модифицированному гаптену – фенила-гидроксифосфинату. Последний является менее токсичным, чем VX-соединение, что упрощает технику проведения экспериментов. В результате иммунизации были получены моноклональные абзимы, катализирующие распад аналога VX-соединения фенилфосфонотиоата с ускорением 14400 раз.

Это исследование доказывает возможность применения каталитических АТ для нейтрализации даже самых активных ядов.

Наконец, работами Landry D.W. с соавт. было показано, что моноклональные каталитические АТ могут гидролизовать кокаин. Авторы считают возможным использовать полученные АТ для терапии наркотической кокаиновой зависимости. В качестве стабильного аналога переходного состояния был использован фосфонатный моноэфир кокаина. Активность одного из полученных АТ была достаточной для проведения доклинических испытаний [228, 229].

Некоторые из моноклональных каталитических АТ уже доступны в качестве коммерческих препаратов. В частности, панель абзимов с альдолазной активностью корпорации Aldrich [310] позволяет получать необходимые стереоселективно чистые альдольные энантиомеры в препаративных количествах (от миллиграммов до граммов продукта).

В будущем спектр доступных моноклональных каталитических АТ будет только расширяться, причем их практическое применение может быть весьма разнообразным и часто непредсказуемым. Даже те авторы, которые до сих пор высказывают сомнения в высокой эффективности абзимного катализа и возможностях его широкого применения [221], согласны с тем, что открытие каталитических АТ

значительно стимулировало исследования в области получения новых биокатализаторов, разнообразных по специфичности и механизму действия.

Иллюстрацией здесь может служить работа Suh J. с соавт., где удалось генерировать протеолитическую активность, используя имидазол, иммобилизованный на твердой фазе. Известно, что имидазольное кольцо гистидина – одна из наиболее часто встречающихся в абзимах каталитически активных групп [300]. Полученные синтетические энзимы превосходили по своей активности все известные к настоящему времени искусственные протеиназы, в том числе и каталитические антитела-протеазы (период полураспада альбумина при pH 7.0 и при $t=25^{\circ}\text{C}$ составлял всего 20 мин).

Наконец, самое неожиданное применение получил сам принцип, по которому происходит образование каталитической активности в антителах – множественное стохастическое образование комбинаторных структур, приводящее к появлению огромного числа специфичностей, селективный отбор которых позволяет получить субстанцию с необходимыми свойствами.

В исследовании X.-D.Xiang с соавт. совместно с одним из основоположников абзимного катализа P.G.Schultz [320] комбинаторный подход был использован для получения материалов, обладающих новыми свойствами (в данной работе – высокотемпературной сверхпроводимостью).

Была синтезирован большой набор (“библиотека”) пленок, состоящих из комплексов различных оксидов металлов (Ba, Bi, Ca, Cu, Pb, Sr, Y). Оксиды комбинаторно объединялись (спекались) друг с другом по специальному шаблону – бинарной маске. Варьировала не только природа оксидов, но и их количественное содержание в образце, последовательность нанесения друг на друга, толщина слоев и т.д.

В результате среди всего разнообразия сочетаний были обнаружены новые образцы, действительно обладающие свойствами высокотемпературной сверхпроводимости. Подобным образом могут быть получены другие соединения с новыми свойствами (электрическими, магнитными, оптическими и т.п.)

Данная работа показала универсальность комбинаторного подхода для направленного получения новых структур, а следовательно – и приобретения новых функций.

На основании всех накопленных данных в середине 90-х годов были сделаны важные теоретические и практические обобщения [232, 233, 282-284], касающиеся дизайна каталитических антител.

Авторы описывают приемы, позволяющие получить каталитически активные МАТ.

Подчеркивается, что даже при иммунизации идентичными иммуногенами можно получить абзимы, принципиально отличающиеся между собой по способу действия.

Первостепенное значение придается проблеме полноты очистки АТ. Обычно их получают аффинной хроматографией на протеинах А или G и/или DEAE-хроматографией. Кроме того, требуются весьма чувствительные методы определения абзимной активности для выявления каталитически активных клонов В-лимфоцитов.

Что же касается механизмов абзимного катализа, то здесь авторы отмечают способность антител катализировать химические превращения практически по любому известному механизму: стабилизации переходного состояния субстрата, общего кислотно-основного катализа, уменьшения энтропии и т.д. Проведенные термодинамические исследования подтвердили все эти положения.

Итак, работы по получению моноклональных каталитических АТ доказали следующее:

- 1) в процессе иммунизации закономерно возникают АТ, проявляющие каталитическую активность;
- 2) доля абзимно активных АТ в общем пуле иммуноглобулинов обычно невелика, хотя при определенных условиях может быть достаточно существенной;
- 3) механизм действия таких АТ чрезвычайно разнообразен, причем АТ могут катализировать большинство известных (и некоторых неизвестных) видов биохимических реакций;
- 4) активность абзимов сильно зависит от микроокружения и кофакторов, взаимодействующих с молекулой (в частности, от ионов металла);
- 5) обнаружение абзимной активности требует высокочувствительных способов ее определения.

Все вышеприведенные данные послужили основой для изучения абзимной активности поликлональных иммуноглобулинов. Учитывая, что при развертывании иммунного ответа в живом организме возникает весьма гетерогенный спектр АТ [11, 94], представля-

лось необходимым изучить образование поликлональных АТ с каталитической функцией в условиях *in vivo*. Такие ИГ могут быть использованы как в биотехнологии, так и в медицине для диагностики и лечения патологических процессов.

ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Одним из наиболее существенных технических вопросов, возникающих при исследовании абзимной активности, является чистота получаемых препаратов абзимов, так как возможное наличие активных примесей ферментов даже в минимальном количестве в препарате иммуноглобулинов приведет к значительному искажению результатов и их неправильной интерпретации. С момента получения первых препаратов каталитических АТ этот вопрос является предметом всестороннего тщательного исследования и анализа.

В настоящее время для оценки абзимной активности применяется целый набор методов. Наиболее распространенным способом очистки ИГ от примесей в этом случае является комбинирование анионообменной (DEAE) хроматографии и аффинной протеин G- (или реже – протеин А) хроматографии (см., в частности, работу Paul S. с соавт. [159]). Подобная комбинация обычно сочетается со вспомогательными методами (высаливанием, диализом и т.п.). Главным требованием является здесь использование способов очистки, базирующихся на разных принципах взаимодействия лигандов.

Основным источником потенциальных примесей в абзимных препаратах является сам исходный материал (сыворотка, асцитическая жидкость, молоко (в случае IgA-абзимов). Сюда можно добавить возможность внешней контаминации материала (например, микроорганизмами).

Необходимо сразу отметить, что иногда подходы к очистке зависят от исследуемой абзимной биохимической реакции. Если в организме лабораторного животного (или человека) отсутствуют

гены ферментов, катализирующих данную реакцию, то очистку ИГ можно упростить, сведя ее к 1-2 стадиям. В этом случае полученная после иммунизации ферментативная активность несомненно принадлежит антителам-абзимам [265, 296]. Это возможно, в частности, после иммунизации микробными ферментами (уреазой [163], пенициллиназой, микробной гиалуронидазой, активной при нейтральных рН 6.5-8.0 [173] и т.д.) Кроме того, получено достаточно абзимов, катализирующих реакции, вообще не имеющие в природе соответствующих ферментов или протекающих в природе иным путем (например, синтез пептидной связи, реакция Дильса-Альдера [284], триптиазная активность [296, 297] и мн. др.)

Однако в большинстве случаев (при изучении протеолитической, оксидоредуктазной или нуклеазной активности) такой подход неприемлем из-за высокого содержания соответствующих ферментов в сыворотке.

Наиболее развернутая схема включает в себя комбинацию многих методов и состоит из нескольких этапов [138, 159, 177]:

- осаждение белков сыворотки сульфатом аммония;
- диализ;
- аффинная хроматография (обычно с использованием матрицы с протеином G или протеином A);
- отмывание буфером с неионным детергентом (обычно Тритон X-100);
- отмывание слабокислым буфером (например, раствором цитрата с рН 4.6-5.0);
- диализ с последующей MonoQ- или DEAE-хроматографией (не всегда используемый этап);
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или гель-фильтрация (обычно на матрице Toyopearl HW 55) в диссоциирующих условиях ("кислый шок" при рН 2.8, или в присутствии раствора 7М мочевины или 6М гуанидин-хлорида), при этом оценивается соответствие профиля элюции ИГ профилю каталитической активности препарата;
- аффинная очистка на антигене-субстрате (белке, ДНК или РНК);
- получение Fab-фрагментов АГ с подтверждением их каталитической активности;
- адсорбция препарата ИГ на сорбенте с анти-ИГ-антителами или с протеином A;

- изучение особенностей каталитической активности полученного препарата абзима (влияние pH, ионной силы, субстратная специфичность) и сравнение их с соответствующим ферментом;
- контроль чистоты полученных препаратов электрофорезом в полиакриламидном геле (ПАГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na) с 2-меркаптоэтанолом или без него с последующей окраской геля нитратом серебра;
- электрофорез полученных абзимных препаратов в полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях (в присутствии ДДС-Na), отмывание электрофореграммы от диссоциирующих реагентов и последующее проведение абзимной реакции *in situ*, т.е. непосредственно в геле по месту локализации абзима.

Вышеприведенные способы очистки иногда сопровождались другими методами, например Cibacron blue 3GA-хроматографией [5]. Весьма щадящим методом выделения IgG является лиганд-аффинная хроматография на гистидил-аминогексил-Сефарозе [248]. Согласно данным [35] для клинических целей можно применять сочетание высаливания 50% сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на колонке HiTrap Protein G Sepharose. После проведения первичного скрининга активности очистку дополняли анионообменной хроматографией на сильном обменнике Mono-Q.

Нами при проведении работы использовалась собственная комбинация методов очистки препаратов IgG для последующей оценки их каталитической активности. Этапы данного комбинированного метода базировались на различных принципах взаимодействия иммуноглобулинов с реагентами.

В схему очистки для первичной обработки сыворотки было введено осаждение сывороточных белков риванолом с последующей обработкой препарата на колонке с активированным углем. Использование риванола обеспечивает удаление альбумина, а также альфа- и бета-глобулинов. Обработка же активированным углем эффективно удаляет низкомолекулярные примеси. Оба применяемых реагента являются дешевыми и общедоступными.

Полученный после этого препарат подвергали DEAE-хроматографии на матрице Toyopearl HW 650M или Молселект DEAE A50, уравновешенной 0,01M фосфатным буфером pH 7,4. Далее проводили аффинную хроматографию, пропуская препарат через колон-

ку с агарозой, конъюгированной с протеином А золотистого стафилококка, уравновешенную 0,1М фосфатным буфером со скоростью 6-7 капль в минуту. После этого колонку последовательно промывали 0,1М фосфатным буфером pH 7,4 с 1% раствором тритона X-305, а затем без детергента в количестве 5-6 объемов колонки до исчезновения белка в элюенте. Элюцию связавшихся иммуноглобулинов класса G (G1,G2,G4) вели 0,1М глицин-HCl буфером pH 2,8 до исчезновения белка в элюенте (отбирали отдельно фракции по 1,5-2 мл). Фракции, содержащие наиболее высокие концентрации белка, объединяли. Иммуноглобулины выделяли переосаждением в 40% растворе сульфата аммония. Преципитировавшие иммуноглобулины осаждали центрифугированием. Осадок растворяли в минимальном объеме фосфатного буфера и диализовали. Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Хранили препараты иммуноглобулинов в пластиковых пробирках в морозильнике при -20°C. Для длительного хранения препараты помещали в сосуд Дьюара с жидким азотом

Каждый из этих этапов требует анализа и сопоставления с вышеизложенными методами.

Вместо предварительного этапа осаждения сульфатом аммония в работе применялась преципитация раствором риванола. Эта методика является более эффективной, так как в отличие от высаливания оставляет в препарате всего 3-5 фракций по данным электрофореза в ПАГ [28], не требует промежуточного диализа и позволяет после обработки активированным углем перевести препарат непосредственно в буфер для следующего этапа – DEAE-хроматографии.

После ионообменной хроматографии нами использовалась аффинная хроматография на стафилококковом протеине А как гораздо более дешевый и не менее эффективный вариант в сравнении с протеином G. Последний, несмотря на более высокую аффинность к ИГ, может связывать и альбумин, помимо IgG [267].

Отмывание колонки раствором неионного детергента представляется неизбежным этапом, так как раствор Тритона X-100 или X-305 успешно диссоциирует достаточно прочные нековалентные комплексы в препарате, вызывая лишь незначительное подтекание ИГ с аффинной колонки. Тем не менее, детергент может изменять нативную конформацию различных белков [33].

Нами не использовалась отмывка слабокислым цитратным

буфером, которая применялась в исследованиях [34]. Это связано со следующим обстоятельством: используемый рН 4.6-5.0 приводит к элюции с колонки целого субкласса (G2) препарата IgG, что подтверждается данными работы [262]. К тому же авторы, использующие данную методику, не обнаруживали примесей энзимов в элюируемой с протеина А фракции при рН 4.6 [34].

Отдельного обсуждения требует применение эксклюзионной ВЭЖХ или гель-фильтрации на матрице Тоуорепл HW 55 в диссоциирующих условиях в качестве одного из этапов очистки. У данной методики есть неоспоримое преимущество: диссоциация ведет к разрушению всех нековалентных комплексов и дальнейшее разделение препарата на матрице приводит к получению чистых ИГ. Ошибка возможна лишь в случае, когда молекулярные массы потенциальных примесей (а, точнее, стоксов радиус их молекул) близки к молекулярной массе IgG [75]. И если использование колонок для ВЭЖХ является дорогим и технически сложным решением, причем наиболее распространенные стальные колонки подвержены коррозии в присутствии ионов Cl^- , то применение полиэтиленоксидных матриц "Тоуорепл" является эффективным и более удобным и дешевым вариантом. Эффективность разделения веществ по молекулярной массе на данной матрице приближается к таковой ВЭЖХ [309]. Объем вносимого на колонку препарата может достигать 1 мл и более, что позволяет использовать гель-фильтрацию в качестве препаративно-го этапа.

Тем не менее, здесь есть несколько принципиальных трудностей. Во-первых, реальное разделение белков гель-фильтрацией (ВЭЖХ-вариант) не превышает соотношения 1:1.5 по молекулярным массам [75]. Теоретически примеси с массами от 100 до 200 тыс Да могут накладываться на пик IgG (150 кДа). Но главным является даже не это обстоятельство. При длительном (час и более) нахождении препарата абзима в диссоциирующих условиях происходит неконтролируемое снижение абзимной активности [5, 67]; (кстати, такое же уменьшение активности может наблюдаться и при использовании сильных анионообменников [5]).

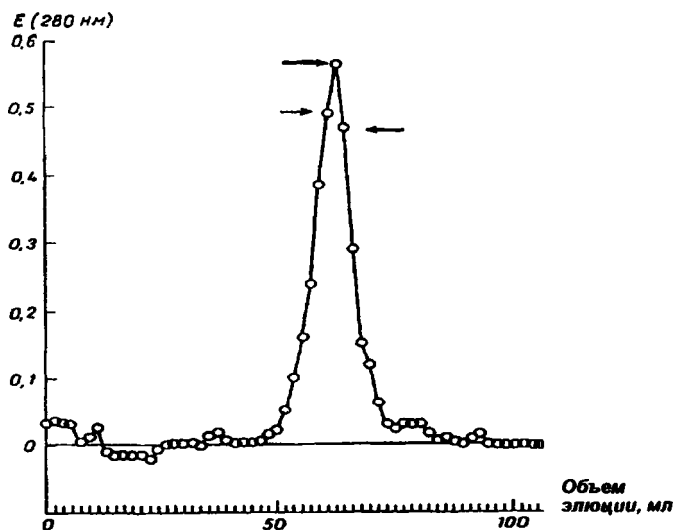
Отсюда гель-фильтрация в диссоциирующих условиях может быть использована на этапе контроля очистки абзимно активного препарата IgG [5, 34]. Несмотря на предполагаемое снижение абзимной активности при хроматографии при рН 2.6-2.8, максимум эн-

зимной активности должен совпадать с вершиной пика ИГ при гель-фильтрации препарата.

В качестве примера на рис.6 нами представлена хроматограмма гель-фильтрации препарата IgG с ДНКазной абзимной активностью на матрице Toyorearl HW-55 в диссоциирующих условиях (в присутствии 0.1М глицин-HCl буфера, рН 2.8).

Что касается использования очистки препарата абзима на антигене-субстрате (например абзимов-нуклеаз на иммобилизованной ДНК [15]), то и здесь возникают затруднения. Аффинная хроматография на иммуногене может применяться, например, при получении моноклональных абзимов [263]. Однако различие в том, что в качестве иммуногена обычно используется не сам субстрат, а стабильный аналог его реакционного переходного комплекса, константа связывания АТ с которым обычно значительно выше, чем с исходным субстратом [287]. В условиях же *in vivo* индуктор появления абзимно активных поликлональных АТ зачастую неизвестен.

Рис. 6. Результаты гель-фильтрации препарата IgG с ДНКазной абзимной активностью на матрице Toyorearl HW55 в диссоциирующих условиях (в присутствии 0.1М глицин-HCl буфера, рН 2.8)



Стрелками указано положение фракций, проявляющих максимальную ДНКазную активность

Кроме того, существует возможность, что высокоэффективные каталитические IgG при очистке на иммуногене-субстрате способны разрушать привитый к матрице субстрат, не связываясь с ним. Чтобы этого избежать, используют либо неразрушаемую ферментом матрицу [34, 36], либо для уменьшения подтекания матрицы проводят все работы на холоду [260]. Это увеличивает неспецифичность связывания ИГ с аффинным сорбентом. Наконец, с такой матрицей потенциально могут связываться не только АТ, но и примесные ферменты, катализирующие ту же или сходную реакцию.

В целом доля каталитически активных АТ в элюируемой фракции не превышает 5%, максимально 20% [82]. Наличие в препарате помимо катализирующих, еще и связывающих субстрат ИГ, приводит к значительным трудностям при определении истинных кинетических параметров поликлональных абзимов.

По мнению многих авторов, до сих пор не существует удовлетворительного способа получения каталитически активных фракций из общего пула поликлональных ИГ [67, 82]. Отсюда мы считаем, что данный метод целесообразно использовать лишь при оценке параметров абзимной активности, а не в качестве рутинного этапа очистки.

В свою очередь, оценка параметров абзимной активности ИГ, а также их Fab-фрагментов является важным доказательством возможных отличий каталитических ИГ от соответствующих ферментов. Что же касается ингибиции абзимной активности анти-IgG антителами, то здесь, вероятно, оптимально использовать только моноклональные АТ, причем отдельно против легких и тяжелых цепей. Применение же поликлональных иммуноглобулиновых фракций малоприемлемо из-за возможной их собственной энзимной и/или абзимной активности.

По полученным нами данным [89] и данным других авторов [34, 36, 177], эффективным способом контроля очистки препаратов IgG является электрофорез в ПАГ в присутствии ДДС-Na с 2-меркаптоэтанолом или без него с последующей окраской геля нитратом серебра. Считается, что окрашивание гелей ионами серебра не уступает по чувствительности радиоавтографии [39, 238, 270]. Существует весьма удобный высокочувствительный вариант методики, где расход серебра значительно снижен [238].

Использованная нами его модификация [74] заключается в сле-

дующем: по окончании электрофореза препараты фиксируют и одновременно вымывают ДДС-На сначала раствором, содержащим 12% CH_3COOH и 50% этанола (10 мин), потом дважды по 5 мин – 5%-ной CH_3COOH с 10% этанола. Далее для улучшения равномерности окраски гель вымачивают 5 мин в 0,5%-ном растворе железосинеродистого калия (красной кровяной соли). После трехкратного ополаскивания в воде гель заливают раствором, содержащим 0,2 г нитрата серебра, 0,2 г нитрата аммония, 0,5 мл 37%-ного формальдегида и 0,06 мг бензотриазола (антиувалирующего средства для фотографии) в 100 мл воды. Гель в растворе освещают лампами накаливания суммарной мощностью 1000 Вт в течение 15-20 мин. Затем раствор сливают и гель, не споласкивая, заливают 200 мл 3%-ного раствора Na_2CO_3 , содержащего 0,1 мл формальдегида и 0,12 мг бензотриазола. Не прекращая освещения, раствор сменяют 2-3 раза до достижения желаемой интенсивности окраски белков. Процесс окрашивания прерывают погружением геля на 5 мин в 1%-ный раствор CH_3COOH , а затем промывают его водой. Полученный окрашенный гель фотографируют, денситометрируют или сканируют для оценки проявленных белковых полос.

Результаты текущего электрофоретического контроля абзимно активных препаратов в присутствии ДДС-На с окрашиванием нитратом серебра по вышеуказанной методике представлены на рис.7.

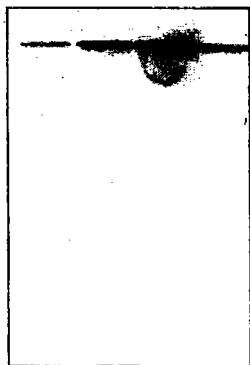


Рис. 7. Электрофорез различных образцов IgG, обладающих абзимной активностью, в присутствии 1% ДДС-На, окраска нитратом серебра

Наконец, при оценке возможного микробного загрязнения полученных препаратов ИГ, по нашему мнению, достаточен посев материала на кровяной агар и среду Сабуро лишь в аэробных ус-

ловиях, что соответствует условиям абзим-субстратной инкубации. Обычно при таком анализе микробного роста не выявляется.

Таким образом, для клинико-экспериментальных исследований абзимной активности применяется комбинация нескольких методов очистки IgG, основанных на разных принципах взаимодействия лигандов. Обычно это сочетание вспомогательных методов с анионо-обменной хроматографией и аффинной протеин А-хроматографией [33, 35].

Использованная нами методика разделяет эти подходы и позволяет получить IgG, пригодный для дальнейшего анализа его абзимной активности и использования в качестве биокатализатора.

ОЦЕНКА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Первые успешные эксперименты по созданию каталитических АТ значительно расширили потенциальный диапазон изучения регуляторных функций АТ и в живом организме. Хорошо известно, что при ответе на АГ появляется обширный набор АТ, различных по аффинности и продуцируемых различными клонами [40].

Часть из них может обладать каталитическим действием. Кроме того, АТ могут оказаться способными к связыванию различных кофакторов (например – ионов металла, пептидов, витаминов), что также может привести к генерации каталитической активности в молекуле ИГ. Как уже отмечалось, механизмы связывания АТ-АГ и фермента с субстратом являются весьма сходными [11], причем не существует принципиальных барьеров, блокирующих использование части энергии связывания для катализа антигена-субстрата.

Отсюда представляется весьма интересным изучить появление АТ, способных к катализу, во время развертывания реального иммунного ответа, а также оценить вклад таких ИГ в физиологические и/или патологические процессы, протекающие в организме. Первые исследования подобного рода были предприняты нами в 1987-1989 гг. Было обнаружено, что поликлональные иммуноглобулины больных диффузными болезнями соединительной ткани (ДБСТ) способны ускорять распад высокомолекулярного полимера гиалуроно-

вой кислоты в сравнении со спонтанным гидролизом субстрата [42, 68]. Для объяснения происхождения подобных иммуноглобулинов нами была впервые выдвинута идиотип-антиидиотипическая гипотеза.

В других исследованиях в первую очередь также были изучены препараты иммуноглобулинов, проявляющие деполимеризующую активность. В качестве субстратов были использованы основные классы биополимеров (белки и регуляторные пептиды, ДНК, РНК, крахмал). Интерес именно к такого рода реакциям представляется закономерным, учитывая потенциальную патогенетическую роль подобных АТ в развитии аутоиммунных заболеваний. Одним из первых направлений в изучении поликлональных каталитических ИГ стала оценка активности абзимов, ускоряющих реакции протеолиза.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Группа, возглавляемая Paul S. [159] с 1989 года проводит обширный цикл исследований протеолитической активности АТ, первоначально выделенных от больных бронхиальной астмой (БА), а затем и при других аутоиммунных заболеваниях. Оказалось, что ИГ способны гидролизовать вазоактивный интестинальный полипептид (ВИП), обладающий многообразными регуляторными эффектами, по единственной связи – между 16 глутамином и 17 метионином. Тем самым АТ проявили уникальную каталитическую специфичность. Выбор ВИП в качестве субстрата для реакции, вероятно, был обусловлен в первую очередь большим опытом работы авторов с данным пептидом, учитывая относительно невысокую выявляемость (18%) АТ к ВИП как у больных бронхиальной астмой, так и у здоровых лиц (16%) [161].

Для регистрации реакции авторы применили метод осаждения радиоактивно меченного ВИП трихлоруксусной кислотой после достаточно длительной (до 6 ч) инкубации с ИГ. Они провели исчерпывающий набор исследований, подтверждающий принадлежность протеазной активности абзимам, а не возможным протеазным контаминатам. В частности, активность сохранялась в препаратах Fab-фрагментов АТ. Кроме того, гидролизуемая связь субстрата нехарактерна для известных протеолитических ферментов [159].

Проведенные кинетические исследования выявили прочное связывания абзимов и субстрата. K_m составила $37,9 \cdot 10^{-9}$ М, время оборота фермента – 15,6/мин. Подчеркивается необходимость близких к физиологическим значений рН для абзимного катализа [255].

Несмотря на немногочисленность обследованных лиц (из 6 больных активность выявлена у 2-х, у здоровых она не выявлялась) авторы заключают о чрезвычайной важности наблюдаемого феномена как для понимания патогенеза бронхиальной астмы, так и для возможности ее терапии [159].

• Эта работа получила широкие отклики, в части из которых высказывались определенные сомнения по поводу объяснения механизмов протеолиза ВИП. Учитывая высокий спонтанный распад меченого радиоактивным йодом субстрата Shokat K. с соавт. предположили возможное участие I^{125} в этом процессе [287], который мог вызывать радиолиз субстратного полипептида.

Тем не менее, исследования группы Paul S. были продолжены. Были получены дополнительные доказательства абзимной протеолитической активности. Авторы провели аффинную очистку АТ к ВИП в некаталитических условиях взаимодействия (при 4°C) и получили увеличение концентрации абзимов в препарате более чем на 3 порядка. Нефракционированные и фракционированные на ВИП АТ гидролизovali его по одной и той же связи [260]. Кроме того, авторы охарактеризовали полученные пептидные фрагменты ВИП при помощи масс-спектрометрии, а также секвенировали их последовательность.

Дополнительные независимые исследования, подтверждающие результаты Paul S. были проведены Goetzi E.J. с соавт. Они обнаружили способность некоторых линий Т- и В-клеток гидролизовать ВИП. Несмотря на то, что сайты гидролиза ВИП клетками не совпадали с вышеописанным, исследование указало на многообразие проявлений каталитической активности АТ и/или клеточных рецепторов [314].

В последующих работах Paul S. с соавт. получили моноклональные АТ к ВИП. Оказалось, что ВИП-специфическая легкая цепь мАТ гидролизует этот белок, тогда как тяжелая цепь мАТ данных АТ, а также легкая цепь мАТ к другому АГ препарат не гидролизovali [242]. Аффинность легкой цепи к ВИП была всего лишь в 4 раза ниже, чем сродство полной молекулы. Сайт гидролиза совпадал с определенным ранее. Комбинация легкой цепи с тяжелой приводила к

замедлению гидролиза. Авторы приходят к выводу, что тяжелая цепь ИГ является модулятором абзимной активности, а в легкой содержится непосредственный центр катализа. Активность легкой цепи сохранялась даже после гель-фильтрации в диссоциирующих условиях в присутствии гуанидинхлорида.

Кроме того, авторы попытались оценить возможную регуляторную роль каталитических АТ к ВИП, учитывая взаимодействие последнего с кальмодулином.

Аналогичные по замыслу исследования были проведены авторами и на клиническом материале [247]. Были исследованы белки Бенс-Джонса (как источник L-цепей) и их вариабельные Fv-фрагменты. В качестве субстрата использовался уже упоминавшийся ВИП, а также конъюгат короткоцепочечного пептида с метилкумарином. Было определено, что 16 из 21 препарата осуществляли гидролиз одного или обоих субстратов, причем кинетические параметры гидролиза для разных препаратов легких цепей были различными. Это свидетельствует в пользу уникальности сайтов протеолитической активности в препаратах. Существенным для катализа являлось наличие основного аминокислотного остатка в расщепляемой связи. Активность белков Бенс-Джонса продолжала сохраняться после гель-фильтрации в диссоциирующих условиях в присутствии 6М гуанидинхлорида. Авторы считают, что протеолитическая активность легких цепей ИГ может проявляться и в реальных патофизиологических условиях.

Li L. с соавт. [156] выделили АТ, специфичные к тиреоглобулину, у больного тиреоидитом Хашимото. Данные ИГ ускоряли гидролиз тиреоглобулина (Км находилась в пределах наномолярных концентраций). После удаления тиреоглобулинсвязывающих АТ из препаратов ИГ аффинной хроматографией, протеолитическая активность последних исчезала.

Другой коллектив исследователей под руководством А.Я.Кульберга (НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи, Россия) одним из первых приступил к изучению каталитических свойств как самих поликлональных IgG, так и их комплексов с кофакторами. Как уже упоминалось, еще в 1968-1969 годах А.Я.Кульберг с соавт. продемонстрировали [70, 71] потенциальную каталитическую активность препаратов поликлональных IgG. Им удалось показать, что при снижении pH среды в препаратах иммуноглобулинов, в том числе – и аффинно очищен-

ных, появляются более мелкие фрагменты белковых молекул, что свидетельствовало об ускоренном протеолизе. Эти результаты были получены при помощи метода пептидных карт.

В других своих работах авторы изучили некоторые другие виды протеолитической активности препаратов поликлональных ИГ, а также их комплексов. Так, было выявлено, что комплексы IgG с R-белками (продуктами катаболизма рецепторов клеточных мембран) обладают достоверной протеолитической активностью, сходной с активностью сериновых протеаз. В качестве субстрата был использован физиологически важный белок фибронектин [62]. Комплекс расщеплял также анилидное производное модельного тетрапептида. Км для данной реакции составила 0.00175М, что свидетельствует о достаточно низком сродстве комплекса и субстрата.

Использование анилидов для оценки протеолитической активности антител (с учетом высокого (приблизительно 9800 [65]) коэффициента молярной экстинкции р-нитроанилина) распространено достаточно широко. Относительная простота, высокая чувствительность и воспроизводимость методов позволяют применять их и в клинических условиях [236].

В наших исследованиях изучалась протеолитическая активность ИГ, выделенных из сыворотки крови больных различными аутоиммунными заболеваниями (системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), аутоиммунным тиреоидитом (АИТ). В качестве субстрата использовался бензоил-DL-аргинин-р-нитроанилид (БАПНА).

Исходя из полученных нами данных, препараты, выделенные от разных больных с одной и той же патологией или даже у одного больного в разные сроки заболевания могли различаться по уровню активности. Кроме того, они по-разному реагировали на изменения внешних условий реакции (рН, ионной силы и т.д. [19, 26]).

В частности, БАПНА-амидазные абзимы демонстрировали в основном широкий оптимум рН со слабо выраженным максимумом в зоне 7.0-8.5. Однако также были выявлены препараты, имеющие 2 оптимума – больший в слабощелочной зоне и меньший – в слабокислой. Это подтверждает каталитическую гетерогенность абзимного препарата.

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ ОКСИДОРЕДУКТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ

В 1988-1989 году А.Я.Кульберг и И.М.Петяев исследовали окислительно-восстановительную активность препаратов иммуноглобулинов. Так, И.М.Петяевым с соавт. [13, 90] было обнаружено, что, с одной стороны, все иммуноглобулины способны катализировать супероксидзависимые процессы в модельных химических системах, с другой – их активность резко увеличивается с образованием иммунного комплекса. В конкретных примерах комплексы состояли из: 1) специфических АТ и АГ вакцинных штаммов чумы; 2) из АТ и динитрофенола. В первом случае комплекс обладал тетразолийий-редуктазной активностью, в другом – супероксиддисмутазной.

Далее были изучены каталитические свойства IgG в комплексе с R-белками – продуктами катаболизма рецепторов клеточных мембран. Было выявлено что как сам комплекс, так и отдельные его составляющие (R-белки и IgG) обладали ферментативной активностью, сходной с супероксиддисмутазой. В целом комплекс был в 100 раз более активен, чем его компоненты [58].

В последующих работах авторы изучили взаимодействия в экспериментальной системе “АГ – рецептор к АГ – АТ к АГ – антиидиотипические АТ” [58, 80]. Антигенами служили арсанيلاتтирозин и динитрофениллизин. АТ и рецепторы, особенно в составе иммунных комплексов, также оказались способными катализировать супероксидзависимые процессы (оценивались по восстановлению нитросинего тетразолия в системе ксантин-ксантиноксидаза). Активность оказалась реципрокной – противоположные по взаимодействию агенты (например – рецептор и антирецептор) были противоположны и по влиянию на генерацию или дисмутацию супероксид-аниона. Не исключается также, что реципрокность была обусловлена конформационными переходами внутри одной и той же молекулы АТ или рецептора. Возможность этого (например – переход идиотипа в противоположный ему по функции антиидиотип) была продемонстрирована авторами в работе [53].

Кроме того, авторы описывают присутствие 2-х разных по родству каталитических центров на одной молекуле АТ [80]. Это косвенно свидетельствует о том, что ферментативная активность абзимов не может быть связана единственно с активным центром антитела.

Исследователи рассматривают также возможное патофизиологическое действие таких АТ, направленное, в первую очередь, на усиление клиренса иммунных комплексов из тканей [80].

Авторам удалось локализовать одни из возможных центров окислительно-восстановительной активности иммуноглобулинов. Ими были получены синтетические обогащенные пролином пептиды, имитирующие строение шарнирного участка (область талии) молекулы ИГ. CPPEL (P-Cys)-пептид утилизировал супероксидный радикал, тогда как APPPEL (P-Ala) этой способностью не обладал. Каталитически активный пептид мог образовывать гекса- и октамеры. Инкубация P-Cys с потенциальным кофактором (ионами цинка) приводила к изменению пути превращения супероксида [56].

Нашими исследованиями было продемонстрировано, что наиболее вероятно центры оксидоредуктазной (в частности) пероксидазной) абзимной активности находятся в Fc-фрагменте молекулы IgG [26], поскольку блокада ИГ свободным протеином А полностью ингибировала пероксидазную реакцию. Известно, что последний связывается с молекулой IgG в области CH_2 -домена.

Выявлено также, что пероксидазная активность препаратов IgG демонстрирует широкий оптимум pH с нечетким максимумом в нейтральной зоне. Наконец оказалось, что препарат пероксидазных абзимов был самым термостабильным, активность мало менялась с изменением температуры. Это может свидетельствовать о том, что данная активность связана с инвариантными участками молекул IgG и мало зависит от переменных участков. Вероятно, тепловые конформационные изменения также затрагивают эту активность в меньшей степени.

НУКЛЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ

Все вышеуказанные исследования подтвердили, что и в живом организме возможна индукция каталитических АТ.

Начиная с 1990 года спектр катализируемых абзимами реакций пополнился новым классом субстратов – нуклеиновыми кислотами [7, 15, 36]. Широкий цикл исследований, касающийся данной проблемы, проводится в институте молекулярной биологии им Н.В.Энгельгардта РАН, институте биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН и Новосибирском институте биоорганической химии СО РАН.

В первоначальных исследованиях для обнаружения абзимов авторы применили уже упоминавшийся антиидиотипический подход [7, 15, 36]. Сходным с вышеописанными был и круг нозологических форм, подвергшихся исследованию (диффузные болезни соединительной ткани, увеоретинит, псориаз, симпатическая офтальмия).

Исходным АГ послужил фермент ДНК-топоизомераза I – энзим, обладающий эндонуклеазной активностью и способный действовать на суперспирализованные формы ДНК. В сыворотках больных были обнаружены различные аутоАТ, которые могли быть отнесены как к идиотипическим, так и антиидиотипическим АТ к данному ферменту. Являясь “внутренним образом” антигена, антиидиотипы смогли осуществить ряд его специфических функций и в том числе – катализ ник-разрывов в цепи ДНК.

Авторы провели исчерпывающий комплекс исследований, подтвердивший наличие ДНК-азной активности именно у антител (контроль с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, аффинную хроматографию на протеине А и субстрате (ДНК), сохранение активности у Fab-фрагментов АТ, сохранение активности после обработки АТ буфером с кислым рН). Данные электрофореза в додецилсульфате Na с серебряным окрашиванием также доказывали гомогенность препарата АТ.

Соотношение субстрат-фермент находилось в пределах 1/100 (вес/вес), время инкубации варьировало от 1 ч до суток. Это оказалось необходимым для достоверной регистрации абзимов в общем пуле поликлональных АТ. Реакция зависела от катионов кальция и магния и ингибировалась ЭДТА.

Следует отметить, что данные исследования подтвердили определенную общность в подходе к регистрации каталитических АТ *in vivo*. Как и в вышеприведенных работах, авторы также использовали весьма чувствительные методы оценки абзимной активности (ВЭЖХ, агарозный электрофорез, метод линейного дихроизма, причем в качестве субстрата использовалась плазмидная суперскрученная ДНК, где мог быть выявлен даже единственный ник-разрыв).

Кинетические исследования показали, что хотя удельная активность абзимов ниже, чем у нативного фермента, но она все равно достаточно высока ($k_{cat}/K_M = 0.32 \text{ min}^{-1} \text{ nM}^{-1}$). Удельная активность абзимов составила 25000 ед./мг АТ. Сродство АТ к субстрату было

также высоким ($K_M - 43 \text{ нМ}$). Сайты абзимного гидролиза ДНК отличались от таковых для ДНКазы I и сывороточной ДНКазы [166].

Авторы подтвердили зависимость активности АТ от вида и стадии аутоиммунных заболеваний, причем она превышала активность абзимов здоровых лиц. Активность “никаз” у больных СКВ была приблизительно в 5 раз выше, чем у здоровых. Наиболее же часто подобная активность встречалась у больных с аутоиммунными заболеваниями органа зрения [177, 178].

Исследователи обнаружили естественный субстрат для природных ДНКазных АТ, изучая их активность при хроническом миелолейкозе, пре-В-клеточном лимфолейкозе, остром миелолейкозе и ВИЧ-инфекции в III-IV стадии болезни [176]. При помощи метода иммунофлюоресценции удалось показать, что абзимы реагировали с ядрами пролиферирующих клеток. В качестве субстрата был идентифицирован внутриядерный фактор с молекулярным весом 35 kDa. Кроме этого, АТ с ДНКазной активностью перекрестно реагировали с основными белками вируса ВИЧ – gp160, gp120 и p65. Последнее может иметь значение в патогенезе ВИЧ-инфекции.

Бунева В.Н. с соавт. продемонстрировали наличие у абзимов не только ДНКазной, но и РНКазной активности [16]. Активность была достаточно высокой, составляя до 20-40% от активности РНКазы А (субстрат – поли (U)). В отличие от всех известных эукариотических РНКаз абзимы гидролизovali олиго-р(А). Оптимальный рН реакции был равен 8.7.

В последующих исследованиях эти же группы авторов [34, 82] детально изучили действие нуклеазных абзимов, их субстратную специфичность, зависимость от катионов двухвалентных металлов.

Нами также была исследована нуклеазная (ДНКазная) активность поликлональных IgG, выделенных от больных аутоиммунными, вирусными и онкологическими заболеваниями [19, 26].

Для ее оценки мы разработали собственный метод определения ДНКазной активности. Он базируется на способности 2-этоксигидрокси-6,9-диаминоакридина лактата (риванола) образовывать сгусток с дезоксирибонуклеиновой кислотой обратно пропорционально ее деполимеризации ДНКазой [77].

Высокая чувствительность и воспроизводимость метода оказались достаточными для определения абзимного действия.

С учетом всех полученных данных было проведено сопостав-

ление предложенного метода с другими способами определения нуклеазной активности абзимов.

До настоящего времени во всех вышеупомянутых работах для оценки ДНКазной активности АТ использовался весьма ограниченный круг способов. В первую очередь здесь следует выделить метод линейного дихроизма – реакции, основанной на способности субстрата (ДНК) по разному взаимодействовать с параллельно и перпендикулярно поляризованным светом [46]. Величина линейного дихроизма субстратной смеси пропорциональна конформации молекул. При гидролизе ДНК происходят практически мгновенные конформационные изменения, что можно зарегистрировать на спектрополяриметре. Метод обладает рядом неоспоримых достоинств. Во-первых, он является сверхчувствительным – при определенных условиях может быть зарегистрирован даже единственный ник-разрыв в цепи двуспиральной ДНК. Во-вторых, расход субстрата в данном способе весьма невелик (микрограммы ДНК в пробе). Время инкубации абзимов с ДНК обычно не превышает 60 минут.

Тем не менее, несомненные достоинства метода линейного дихроизма предопределяют и ряд его недостатков. Один из наиболее существенных – необходимость применения особого субстрата – суперспирализованной формы плазмидной ДНК (в частности плазмиды рUC 19 [46]). Это связано с тем, что для точной оценки линейного дихроизма ДНК требуется предварительная однотипная ориентация молекул нуклеиновой кислоты. Приготовление такого субстрата требует отдельной многоэтапной методики очистки (ультрацентрифугирование, хроматография и обработка рестриктазами).

Очевидным недостатком является потребность в использовании специального регистрирующего оборудования. Кроме того, регистрация реакции при 260 нм исключает возможность прямого исследования более сложных реакционных смесей (сывороток, ИГ в большей концентрации, микроорганизмов, культуральных жидкостей) без стадии предварительного осаждения белков, также поглощающих в УФ-диапазоне.

В целом данный метод достаточно сложно использовать в клинических условиях для оценки ДНКазной абзимной активности широкого ряда иммуноглобулиновых препаратов.

Поэтому в настоящее время с этой целью используется методика электрофореза продуктов ДНКазной реакции в агарозе с класси-

ческой окраской геля бромистым этидием. Этот способ, помимо необходимости применять специальное электрофоретическое оборудование, также потребовал адаптации к определению ДНКазной активности абзимов. Чувствительность метода, вероятно, оказалась ниже, чем у предыдущего, так как потребовалось изменить условия реакции, увеличивая концентрацию АТ до 0.1-1.0 мг/мл [33, 73, 95] и удлиняя время инкубации до 5 и далее до 12 часов [33].

Для повышения чувствительности метод по-прежнему требовал в качестве субстрата суперскрученной плазмидной ДНК [33].

Метод электрофореза в агарозном геле в исходном варианте не является количественным. Для придания ему количественного характера авторам потребовалось разработать 10-балльную шкалу, основанную на визуальной оценке глубины деградации субстрата. Без использования денситометра такой учет также является субъективным [33].

Кроме того, регистрирующий агент (бромистый этидий), является достаточно дорогим и небезопасным реактивом (химический канцероген).

Данный метод уже можно применять для одновременного исследования ряда проб, однако при одномоментном исследовании десятков образцов необходимо использовать несколько пластин с гелем.

Вышеизложенные методы являются основными при оценке ДНКазной абзимной активности. Иногда, обычно для доказательства принадлежности ДНК антителам, проводят электрофорез ИГ в полиакриламидном геле, содержащем ДНК, вымывают ДДС-Na и окрашивают гель бромидом этидия, проявляя зоны гидролиза [34]. Этот способ применяется менее часто.

Наконец, достаточно широко используется еще один метод определения нуклеазной активности. Чаще всего его применяют для определения субстратной специфичности абзимов с ДНКазным или РНКазным действием. Субстратами в этом методе являются стандартные синтезированные нуклеотиды, меченные радиоактивно [^{32}P] [16, 34]. После реакции проводят либо электрофорез продуктов с радиоавтографией гелей, либо осаждают белки реакционной смеси с помощью трихлоруксусной кислоты и подсчитывают радиоактивность на счетчике.

Вышеописанный способ является сложным в постановке, требует синтеза субстратов, дорогостоящего оборудования и неприме-

ним для массовых исследований. Кислотные осадители могут вызывать дополнительные разрушения нуклеиновой кислоты, даже при незначительном контакте с ней [102]. Следует также иметь в виду, что осаждаемая фракция далеко не всегда представляет неразложенную, интактную нуклеиновую кислоту. На самом деле, это весьма сложная смесь, состоящая главным образом из относительно крупных олигонуклеотидов и, возможно, небольшого количества нуклеиновой кислоты, доля которой в этой фракции зависит от длительности инкубации и концентрации энзима, что может привести к ошибочным заключениям [72, 102]. Кроме того, по нашим наблюдениям, методы, основанные на осаждении, зачастую являются не очень хорошо воспроизводимыми.

Суммируя все вышеизложенное, можно заключить, что разработанный нами способ оценки ДНКазной абзимной активности обладает рядом преимуществ перед другими методами. В первую очередь, он не требует специальных субстратов и дорогостоящего оборудования. Используемый хромофор риванол дешев, легко доступен, безопасен, обладает высокой молярной экстинкцией, что увеличивает чувствительность способа. Метод пригоден для массовых исследований с детекцией реакции как визуально (полуколичественно), так и с применением любого регистрирующего прибора (фотоэлектроколориметра, спектрофотометра или флюориметра).

Воспроизводимость метода также является высокой (коэффициент его вариации составил менее 10%)

Что касается чувствительности способа, то он, уступая методу линейного дихроизма, тем не менее открывает препараты с высокой абзимной активностью при инкубации в течении 1-2 часов. Однако, по нашему мнению, для достоверного обнаружения абзимов с меньшей активностью время инкубации следует удлинить до нескольких часов. В работе использовали 20-часовую абзим-субстратную инкубацию, так как предлагаемая другими авторами 12-часовая инкубация [33] является весьма неудобной для практического применения.

Схема постановки способа заключается в следующем:

к 0,2 мл раствора ДНК в концентрации 300-400 мкг/мл (оптическая плотность образующегося сгустка ДНК, приготовленного ex tempore, должна находиться в пределах 0,35-0,45 ед. опт. плотности) добавляют 0,1 мл препарата IgG (1 мг/мл) и 0,1 мл 0,02 М трис-HCl буфера pH 7,4 с 0,004 М $MgCl_2$. В контроле вместо 0,1 мл ИГ использу-

ют 0,1 мл 0,15 М NaCl. Постановка реакции проводится в центрифужных пробирках. После инкубации в течение 20 часов при 37°C на поверхность проб наслаивают 20 мкл 0,75% раствора риванола и встряхивают до получения сгустка. Затем сгусток 2-кратно отмывают дистиллированной водой и растворяют при кипячении в 0,5 мл 1н HCl, после чего объем доводят до 2 мл дистиллированной водой. Пробы ставятся в дублях. Проводят спектрофотометрию при 410 нм. Величины ДНКазной активности определяют по формуле (см. ниже) и выражают в условных единицах (УЕ):

$$A = (1 - E_o / E_k) * 100\%$$

где А – величина активности (УЕ), Е_к – средняя оптическая плотность контрольных проб, Е_о – средняя оптическая плотность опытных проб.

При проверке чувствительности предлагаемого способа в качестве метода сравнения использовали один из наиболее чувствительных (но трудоемких) методов оценки ДНКазной активности – вискозиметрию. Предлагаемый нами способ превосходил его по чувствительности более чем в 10 раз.

При оценке специфичности метода было выявлено, что коэффициент линейной корреляции между оптической плотностью и содержанием фермента в пробе составил -0,96 (p=0,01), сила влияния содержания ДНКазы на оптическую плотность по результатам однофакторного дисперсионного анализа составила 91,72% (p<0,01).

В качестве субстрата в нашем способе использовался обычный коммерческий препарат ДНКазы. Кроме препарата ДНК тимуса теленка фирмы “Sigma”, который применяли для оценки активности абзимов, для определения нуклеазной активности иного происхождения можно применять более дешевый субстрат ДНК из эритроцитов цыплят производства “Reanal”.

Разработанный способ работоспособен в широком диапазоне рН и ионной силы, что увеличивает его применимость. В частности, до концентрации 0,5М NaCl оптическая плотность проб оставалась неизменной, при дальнейшем нарастании ионной силы раствора она несколько увеличивалась. Что касается рН, то способ был работоспособным от рН, равном 3 и выше.

Оптическая плотность проб после проведения реакции оставалась стабильной не менее суток [27].

Разработанный нами метод оказался пригодным для массовых исследований. При использовании отечественного мультискана АИФ Ц01С одновременно можно количественно учитывать до 40-45 дублированных проб в стандартном 96-луночном планшете. Полуколичественный же вариант способа (по балльной методике) не требует специальной аппаратуры для учета реакции, который может быть проведен визуально.

В целом метод пригоден для широкого тестирования препаратов поликлональных ИГ на ДНКазную абзимную активность, в том числе и в клинических условиях.

То, что предложенный способ действительно регистрирует снижение молекулярного веса ДНК под действием абзимов, было подтверждено параллельным проведение электрофореза продуктов дегградации ДНК в 1% геле агарозы (рис.8-9).



Рис. 8. Агарозный электрофорез продуктов распада ДНК под действием IgG больной язвой 12-перстной кишки (окраска бромидом этидия, 1 мкг/мл)

- I – Инкубация в течение 24 ч (опыт)
- II – Контроль (24 ч)
- III – Инкубация в течение 48 ч (опыт)
- IV – Контроль (48 ч)

Результаты электрофореза в агарозе свидетельствуют, что IgG действительно вызывают распад ДНК на низкомолекулярные фрагменты. При изучении электрофореграмм выясняется, что степень гидролиза ДНК под действием IgG от больных с разной патологией является также весьма различной. IgG больной СКВ вызывали выраженный распад субстрата, тогда как ИГ от больного с патологией желудочно-кишечного тракта (в одной и той же концентрации и при

одинаковом времени инкубации) только понижали средний молекулярный вес ДНК без ее глубокой деградации. Это показывает гетерогенность абзимного действия ИГ в отношении одних и тех же субстратов и ведет к значительной вариабельности их реагирования с ними.

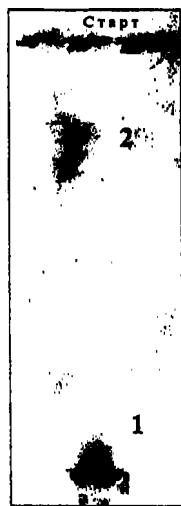


Рис. 9. Агарозный электрофорез продуктов распада ДНК под действием IgG больной СКВ (окраска бромидом этидия, 1 мкг/мл)

- 1 – Инкубация IgG с ДНК в течение 24 ч (опытная проба)
- 2 – Буферный раствор (24-часовая инкубация, контрольная проба)

Дополнительные эксперименты выявили некоторые особенности ДНКазной активности поликлональных IgG.

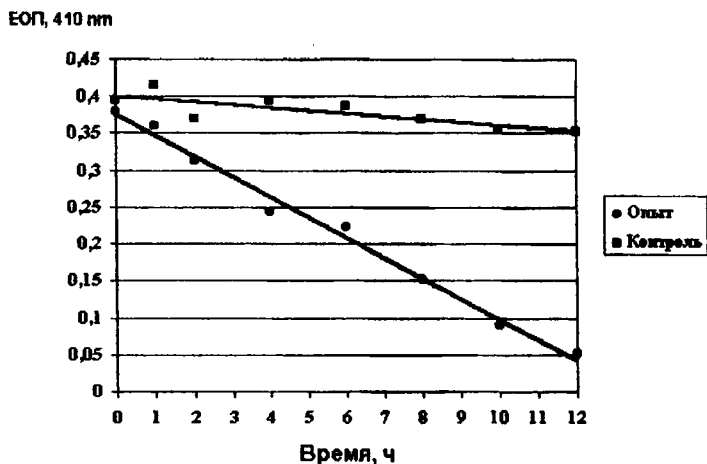
Глубина превращения всех субстратов, как и ожидалось, была пропорциональна концентрации ИГ, взятых в реакцию.

В свою очередь, кинетические кривые абзимных реакций продемонстрировали (по крайней мере в первые часы инкубации, рис. 10) линейный характер зависимостей, что свидетельствует об условиях насыщения абзима субстратом и нулевом порядке протекания реакций [14].

Кроме того, как уже упоминалось выше, была проведена хроматография абзимно активных препаратов IgG на матрице Toyopearl HW55 в кислом глицин-HCl-буфере pH 2.8 и изучен профиль каталитической активности полученных элюатов (при хроматографии в кислом буфере происходит диссоциация нековалентных комплексов (например – иммунных), потенциально присутствующих в препарате). В результате такой обработки (и за счет разведения препарата на колонке) активность снизилась, однако ее максимум совпал с вершиной пика фракции IgG (рис. 6, представлен препарат с ДНКаз-

ной активностью, выделенный от больной СКВ). Тем самым было получено подтверждение связи абзимной активности с фракцией IgG.

Рис. 10. Зависимость гидролиза ДНК от времени инкубации с абзимами



Температурный оптимум для препарата IgG с ДНКазной активностью совпадал с физиологическим и был равен 37°C. При увеличении температуры инкубации до 56°C активность заметно снижалась. Эти результаты в целом подтверждаются и другими данными по изучению термостабильности абзимных нуклеаз. В частности, при прогреве при 60°C IgG с РНКазным действием активность последних снижалась на 90% от исходной [95].

По полученным нами данным, ДНКазные абзимы функционируют в широком диапазоне pH со слабым максимумом активности при 7.0-8.0. Аналогичная pH-зависимость отмечается и в других исследованиях [82]. Однако были найдены образцы, имеющие не менее 2 оптимумов – больший в слабощелочной зоне и меньший – в слабокислой. Это подтверждает каталитическую гетерогенность абзимного препарата.

После превышения некоторой пороговой концентрации NaCl в среде (около 0.05 М и выше) ДНКазная абзимная активность IgG значительно снижалась. Это свидетельствует о существенном вкладе ионных взаимодействий в связывание таких абзимов с субстратом.

НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ВИДЫ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

С учетом большого разнообразия активных центров ИГ можно было ожидать, что спектр реакций, катализируемых антителами, также является весьма широким. Проводимые в этой области исследования в целом подтвердили это положение.

Так, I.Salama с соавт. [168] в 1988 году описали явление лизиса эритроцитов под действием АТ у больных с анемией, вызванной холодовыми агглютинидами без участия комплемента в этом процессе. Авторам не удалось обнаружить мембрано-атакующих комплексов комплемента C5b-C9 на поверхности эритроцитов, в то время как АТ, направленные против I-АГ эритроцитов, элюировались с их поверхности и были способны производить гемолиз. Вызывает очевидный интерес зависимость такого рода активности АТ от пониженной температуры (0-20°C). Хотя эксперименты по определению гемолитической активности Fab-фрагментов АТ не дали однозначных результатов, описанное явление, несомненно, требует дальнейшего тщательного изучения.

Nilsson B. с соавт. в своей работе продемонстрировали способность антиидиотипических АТ влиять на процесс активации комплемента, вызывая превращение одного из ингибиторов C3-компонента [249].

Нашими исследованиями в 1987-1989 годах было показано, что поликлональные иммуноглобулины больных ревматоидным артритом способны ускорять распад гиалуроновой кислоты (ГК) по сравнению со спонтанным гидролизом субстрата [42].

Использование иммунохимических, электрофоретических и хроматографических методов исследования подтвердило гомогенность полученных абзимных IgG.

Были проведены и другие исследования, подтверждающие чистоту выделенных иммуноглобулинов. В частности, микробиологический анализ препаратов ИГ подтвердил отсутствие микробной контаминации при инкубации в аэробных условиях.

Для данного вида абзимной активности существуют также дополнительные доказательства принадлежности каталитической активности самим ИГ, а не сывороточному ферменту. Это связано с тем, что сывороточная (лизосомальная) гиалуронидаза совершенно не способна действовать при $pH > 5,0$.

Такой результат был получен в работе [173] с применением самого чувствительного в настоящее время способа определения гиалуронидазной активности иммуноферментным методом. В свою очередь, эксперименты по оценке абзимной гиалуронидазной активности проводились при рН 7.4, где сывороточная гиалуронидаза полностью ингибирована.

Микробные гиалуронатлиазы функционируют и в нейтральном диапазоне рН. Однако все они являются сильными антигенами, вызывая тем самым образование ферментнейтрализующих АТ. Поэтому в составе общего пула антител в организме постоянно циркулируют антигиалуронидазные ИГ, поддерживающие достаточно выраженный уровень антигиалуронидазной активности даже у здоровых индивидуумов [45, 59]. Кроме того, в монографии L.Cinader с соавт. [122] показано, что эти бактериальные энзимы ингибируются соответствующими АТ на 100%.

Таким образом, вышеизложенное подтверждает принадлежность каталитической активности самим молекулам IgG.

Для оценки абзимного действия применялся метод определения гиалуронидазной активности по предупреждению сгусткообразования гиалуроновой кислоты риванолом [3, 92].

Прямое же доказательство распада гиалуроновой кислоты под действием антител было получено с помощью гель-фильтрации продуктов реакции на матрице Toyopearl HW75.

Результаты хроматографии изображены на рис.11.

В данном эксперименте сравнивали гидролиз гиалуроновой кислоты под влиянием АТ со спонтанным распадом субстрата за время инкубации. Очевидно, что контрольный препарат субстрата состоял из молекул преимущественно 3-х молекулярных масс (пики 1,2,3, соответственно).

После инкубации в опытной пробе 1 пик почти исчезает, зато увеличивается площадь 2-го и 3-го. Оказалось возможным приближенно оценить и его молекулярную массу. Это было сделано при помощи декстрана голубого с молекулярной массой около 2 млн Да. Обычно его используют для оценки свободного объема колонки, учитывая в особенности то, что некоторая часть молекул декстрана превышает вышеуказанную массу [75]. Однако в данном случае и его молекулярного веса недостаточно, поскольку разрешаемая область матрицы Toyopearl HW75 лежит в пределах 100 тыс – 10 млн Да по

декстранам [309]. Выяснилось, что 1 пик ГК выходит из колонки, примерно соответствуя декстрану-маркеру.



Таким образом, результаты настоящего эксперимента позволяют заключить, что в данном случае распаду подверглась наиболее высокомолекулярная фракция гиалуроновой кислоты. Отсюда следует, что не все молекулы субстратной смеси равновероятно подвержены действию антител. Возможно, что только высокомолекулярная ГК способна вступать в реакцию с данным образцом АТ, являясь истинным субстратом. Кроме того, проведенный опыт дал прямые доказательства уменьшения молекулярной массы продуктов гидролиза а, следовательно – гиалуронидазного действия поликлональных IgG.

Следует отметить, что обнаружение АТ, вызывающих ускорение распада гликозаминогликанов, не было полностью неожиданным явлением. Bradbury M.G. с соавт. описали наличие рецепторов к различным гликозамингликанам на лимфоцитах [154]. Не исключено, что часть энергии специфического связывания лиганда этими рецепторами может быть использована для катализа гликозаминогликанов.

Адсорбция препаратов ИГ на сорбенте со стафилококковым протеином А выраженно снижала абзимную активность остающегося препарата.

Эксперименты по исследованию абзимной активности Fab-фрагментов подтвердили, что гиалуронидазная активность ИГ сохраняется в препаратах Fab-фрагментов, несмотря на некоторое ее снижение.

Отсюда можно заключить, что гиалуронидазная абзимная активность связана с Fab-фрагментом и, вполне вероятно, с активным центром ИГ [20, 26].

Препарат гиалуронидазных абзимов обладал широким оптимумом рН с максимумом в нейтральной зоне. Этот параметр сходен с рН действия микробных гиалуронатлиаз и совершенно не совпадает с оптимумом сывороточной лизосомальной и тестикулярной гиалуронидаз [37, 38, 173].

Наконец, гиалуронидазная абзимная активность была максимальной при 37°C. Тем не менее, она сохранялась и после прогревания при 56°C. Это не совпадает с действием микробных гиалуронидаз, которые в таких условиях полностью ингибируются.

Помимо исследования абзимов деполимеризирующего действия, в последнее время все шире изучаются другие виды каталитической активности поликлональных Ig, причем проведенные исследования также подтвердили возможность появления каталитических АТ в обычном иммунном ответе и после искусственной иммунизации.

Так, Tawfik D.S. et al. [313] провели иммунизацию мышей линии MRL/lpr, SJL (аутоиммунные линии), а также MRL/++ и Balb/c (контрольные линии) аналогом переходного состояния р-нитробензилфосфонатом для индукции АТ с эстеразной активностью. Оказалось, что способность клонов аутоиммунных мышей продуцировать абзимы была в десятки раз выше, чем у контрольных. Особенно это проявлялось при первичных иммунизациях. Эстеролитические АТ не появлялись при контрольных иммунизациях другими гаптенами. Авторы обсуждают возможность участия абзимов в патогенезе заболеваний.

Johnson G. с соавт. получили поликлональные антиидиотипические АТ к холинэстеразе и доказали их абзимную активность (АТ гидролизировали ацетилхолин и бутирилхолин). Ход реакции подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен [218].

В свою очередь, Cederholm-Williams S.A. получил патент на антиидиотипические абзимы – активаторы фибринолиза, способные переводить плазминоген в плазмин [253]. АТ были получены при помощи гетерологичной иммунизации. В качестве первичного иммуногена была использована стрептокиназа, а вторичного – Fab-фрагменты антистрептокиназных идиотипических АТ.

В работе Stephens D.B. с соавт. [265] обсуждаются возможные пути получения и использования поликлональных каталитических АТ в результате обычной иммунизации. Авторы считают, что необходимо провести тщательный анализ созревания каталитической активности ИГ, возникающей при иммунном ответе. Перспективно использование таких АТ как иммунотерапевтических препаратов.

После первых результатов успешного обнаружения природных каталитических АТ, вероятным направлением дальнейшей работы представлялось – как в случае моноклональных абзимов – изучение их взаимодействия с различными усилителями активности, например – с кофакторами (ионами металлов, коферментами и т.д.). Однако к настоящему времени такая работа была проведена главным образом для абзимной нуклеазной активности [95], где в роли кофактора выступают ионы марганца, магния, кальция или цинка. Хотя, как отмечалось, металлы переходных валентностей способны взаимодействовать с поликлональными Ig различных классов.

В частности, метод металло-хелатной хроматографии (МХХ) с недавнего времени начал применяться для очистки иммуноглобулинов (Al-Mashikhi S.A. с соавт., Hale J.E. с соавт. [116, 117, 200]). Удалось обнаружить также наличие аутоантител к некоторым из катионов металлов переходных валентностей – Ni(II), Co(II), Cr(III) – у больных, например, у пациентов с имплантированными металлическим протезами крупных суставов [321].

В своем теоретическом исследовании Radulescu R.T. [271] провел сравнительный анализ последовательностей аминокислот константного участка ИГ различных классов. Автор обращает внимание на наличие потенциальных металл-связывающих сайтов, богатых цистеином и гистидином. Кроме того, обнаружен структурный мотив серин-пролин-X-X и треонин-пролин-X-X, который также может обладать этой функцией. Полученные данные не рассматриваются в связи с возможной абзимной активностью ИГ, однако это представляется весьма вероятным.

Наконец, А.Я.Кульберг с соавт. [54, 55] изучили взаимодействие поликлональных IgG с катионами меди и также обнаружили, что субфракции поликлональных IgG значительно отличаются по сродству к данному катиону. Автор приходит к заключению [55], что такие ИГ могут выступать в роли регуляторов концентрации свободных радикалов в организме, участвуя в окислительно-восстановительных процессах.

Вышеприведенные литературные данные [116, 117, 241, 271] свидетельствуют о необходимости дальнейшего исследования взаимодействия поликлональных IgG с катионами металлов. Результатом такого взаимодействия может быть индукция (или в более общем случае – модуляция) каталитической активности препарата ИГ. Это существенно в практическом отношении для изучения патогенеза аутоиммунных заболеваний. В свою очередь, фракционирование IgG на сорбенте с катионами металла может увеличить выход каталитических фракций ИГ и тем самым способствовать получению более дешевых поликлональных абзимов.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ С ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ И ОЦЕНКА ИХ ВЛИЯНИЯ НА АБЗИМНУЮ АКТИВНОСТЬ

После анализа результатов первичного скрининга абзимной активности была отобрана часть препаратов IgG для дальнейшего исследования их взаимодействия с катионами. В первую очередь были исследованы IgG, полученные от лиц без признаков аутоиммунной патологии (контрольная группа доноров крови).

Для увеличения исходного количества материала, а также нивелирования индивидуальных различий взаимодействия, в общий пул ИГ были объединены препараты, выделенные от различных доноров. Этот препарат затем был использован для металло-хелатной хроматографии. После проведения металлохелатной хроматографии IgG на колонках силикагеля с иминодиуксусной кислотой (ИДК), связанной с катионами Cu(II), Ni(II), Co(II), Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cr(III), Mn(II), было выявлено, что катионы металлов различаются по своей способности взаимодействовать с поликлональными IgG доноров [323]. Ионы Ca, Mg, и Cr не связывали IgG доноров при

металло-хелатной хроматографии. Отмечалась лишь небольшая задержка времени элюции ИГ в сравнении с выходом свободного объема. Напротив, другие катионы прочно фиксировали определенное количество IgG на ИДК-сорбенте. Так, 43% от нагруженного IgG связывалось с ионами меди, 28,5% – никеля, 25,9% – цинка, 17,64% – кобальта, 11,76% – марганца [18, 21, 25].

Была обнаружена слабая достоверная БАПНА-амидазная активность донорских комплексов IgG-Cu (реакция ускорялась в 4-5 раз по сравнению с контролем). Комплексы донорских фракций ИГ с другими Me не обладали подобной активностью. Известно, что фермент трипсин обладает, помимо протеолитической, еще и выраженной эстеразной активностью. Однако нам не удалось обнаружить БАЭЭ-эстеразной активности в исследованных комплексах (БАЭЭ – бензоил-L-аргинина этиловый эфир).

Также нам не удалось обнаружить собственной ДНКазной активности МХХ-фракций IgG доноров ни с одним из исследованных катионов. Донорский IgG практически не связывался с ИДК-Mg-сорбентом при проведении МХХ (как и с матрицей ИДК-Ca(II)). Этот факт, возможно, имеет самостоятельное значение, т.к. катионы магния и кальция являются одними из наиболее физиологически значимых. Причины этого явления (недоступность данных катионов на матрице при МХХ или, наоборот, отсутствие структурных мотивов в молекулах IgG здоровых лиц для связывания катионов Mg(II) и Ca(II), или возможное конформационное экранирование этих мотивов) пока неясны.

Рис. 12. Профиль элюции иммуноглобулинов растворами различных аминокислот (Три, Цис) с ИДК-сорбента

ЕОП

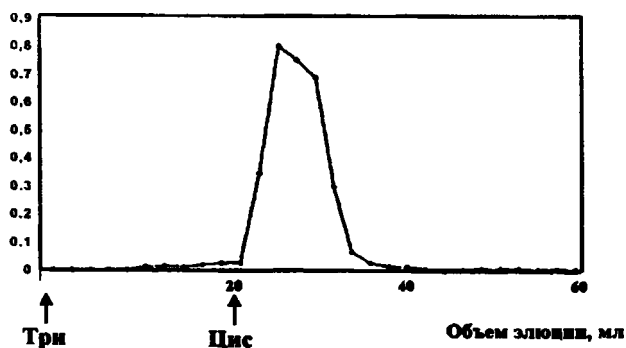


Рис. 13. Профиль элюции иммуноглобулинов растворами различных аминокислот (Лиз, Сер, Глу), а также ЭДТА с ИДК-сорбента

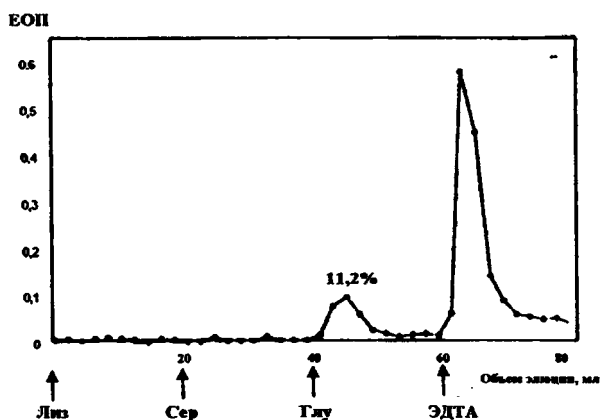
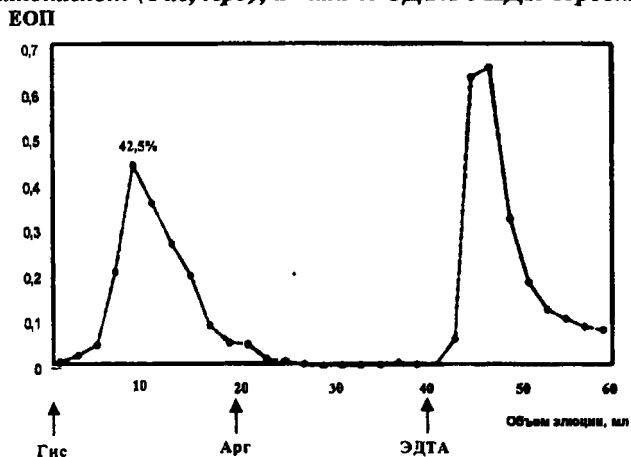


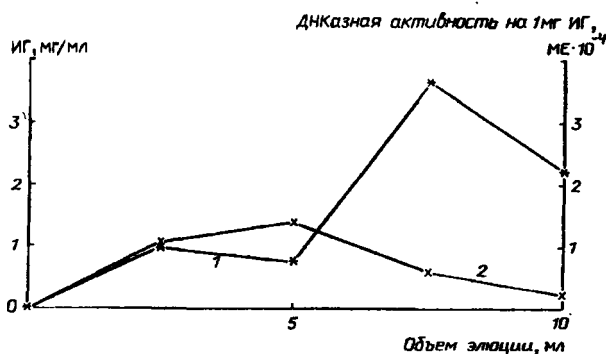
Рис. 14. Профиль элюции иммуноглобулинов растворами различных аминокислот (Гис, Арг), а также ЭДТА с ИДК-сорбента



Данные об элюции IgG различными аминокислотами, 0.1 М глицин-HCl буфером, pH 2.8 и раствором ЭДТА показали, что 100% связанного IgG элюируется раствором цистеина, 42.5% – гистидина, 11,9% – глютаминовой кислоты. Другие аминокислоты (Arg, Trp, Lys, Ser) весьма слабо влияли на связывание. Глицин-HCl буфер (0.1M, pH 2.8) и раствор ЭДТА элюировали весь связавшийся ИГ (рис.12-14).

Далее была изучена металлозависимая абзимная (в частности – ДНКазная) активность ИГ, выделенных из сыворотки крови больных. Для увеличения количества исходного материала в первоначальных экспериментах использовался препарат IgG, полученный из плазмы больной СКВ после плазмафереза. Предварительно было показано, что эти IgG обладают собственной ДНКазной активностью в присутствии ионов $Mg(II)$. Результаты хроматографии этих ИГ на колонке ИДК-Mg и определение ДНКазной активности образующихся фракций представлены на рис.15. Оказалось, что при проведении МХХ отмечается задержка на сорбенте фракции IgG, обладающих ДНКазной активностью. Это свидетельствует о взаимодействии таких ИГ с матрицей ИДК-Mg. В свою очередь, полученные в ходе данного эксперимента в минимальном количестве IgG после элюции ЭДТА не выявили собственной ДНКазной активности [25].

Рис. 15. Хроматография ИГ больной СКВ, обладающих ДНКазной активностью, на матрице МХХ-Mg



1 — абзимная активность, 2 — концентрация ИГ

Полученные данные подтвердили существенные различия в каталитической активности комплексов IgG-катион металла в зависимости от источника выделения препаратов IgG (доноров крови или больных аутоиммунными заболеваниями).

Исходя из этого, для последующих экспериментов были отобраны образцы IgG больных, проявляющие собственную каталитическую активность, и изучено изменение этой активности под влиянием катионов Me.

Оказалось, что некоторые IgG проявляют активность независимо от катионов, однако абзимная активность другой части препаратов зависела от присутствия катионов металла в реакционной смеси. Их свойства изучались в дальнейших экспериментах.

В результате проведенных исследований было выявлено, что катионы металлов оказывают существенное воздействие на каталитическую активность IgG. Примеры влияния разных катионов на конкретные препараты IgG с различной абзимной активностью представлены на рис. 16-19.

Рис. 16. Увеличение ДНКазной абзимной активности под влиянием катионов металлов

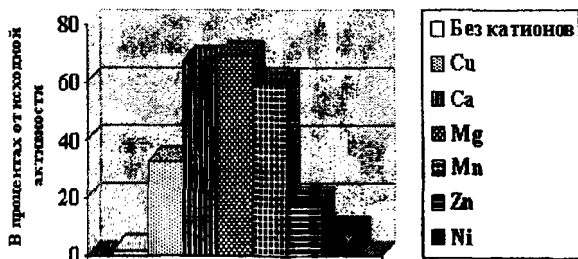


Рис. 17. Увеличение гиалуронидазной абзимной активности под влиянием катионов металлов

В процентах от
исходной
активности

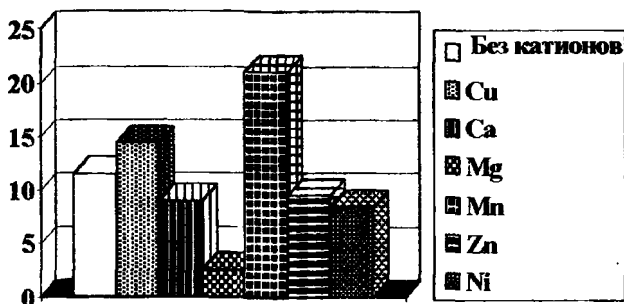
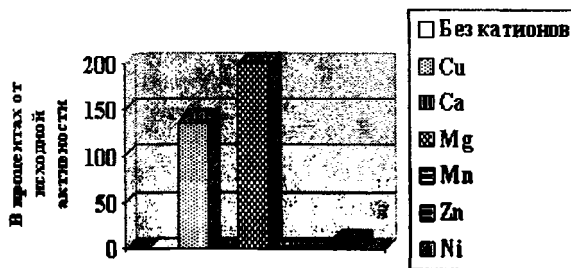


Рис. 18. Увеличение БАПНА-амидазной абзимной активности под влиянием катионов металлов



Рис. 19. Увеличение пероксидазной абзимной активности под влиянием катионов металлов



Примечание. По вертикальной оси рис. 16-19 представлено ускорение абзимной реакции (в процентах) в сравнении с контрольным распадом субстратов (соответствует нулевой линии).

При анализе полученных результатов выявляется, что наиболее высокой удельной каталитической активностью обладают IgG, проявляющие ДНКазную абзимную активность. Далее следуют пероксидазная активность, а затем гиалуронидазная и БАПНА-амидазная. Последние менее подвержены модулирующему действию катионов [98].

Обнаружены определенные закономерности во взаимодействии абзимов с катионами металлов.

В частности, ДНКазная активность в большинстве случаев активируется катионами магния ($70,0 \pm 8,51\%$, $n=30$) и марганца

(73,33±8,21%, n=30), а затем кальция (50,0±9,28%, n=30), однако найдены IgG, активируемые катионами цинка, меди и никеля (реже всего). Здесь следует отметить следующее обстоятельство: Zn-зависимая ДНКазная активность (при 2-х-часовой инкубации) была обнаружена у всех отобранных больных с эндокринной патологией (9 человек), редко выявлялась при диффузных болезнях соединительной ткани – ревматоидном артрите (у 2 больных из 9) и не обнаруживалась при других изученных видах патологии. Разность по частоте встречаемости этого признака была высоко достоверна ($p < 0.001$).

Пероксидазная активность в большинстве случаев (приблизительно 80%) стимулируется катионами меди (II); в свою очередь, катионы магния обладали стимулирующим действием во всех исследованных случаях. Особенно это было заметно в пробах с невысокой исходной активностью. Кроме того, ионы Cu (II) вызывают значительный спонтанный распад субстрата. Катионы же магния ускоряют распад перекиси водорода только совместно с абзимами, выделенными от различных больных.

Гиалуронидазная активность изученных абзимов невелика, тем не менее она может быть активирована катионами марганца (58,82±12,3%, n=17), цинка (56,25±12,81%, n=16) и кальция (53,85±14,39%, n=13).

БАПНА-амидазная активность ИГ наиболее вариабельна. Амидазная активность большей части проб мало меняется под действием катионов металлов. Можно отметить некоторое активирующее действие катионов кальция (в 38,1±10,86% случаев, n=21) и цинка (25,0±9,03%, n=24).

Учитывая отчетливый активирующий эффект некоторых катионов металла на абзимную активность, была проведена металлохелатная хроматография IgG на различных катионах с последующим исследованием каталитической активности полученных фракций. На основании проведенных экспериментов было выдвинуто предположение, что вследствие различного сродства IgG к МХХ-матрице можно получить фракции препарата с увеличенным содержанием каталитических АТ.

Для получения большего исходного количества препарата IgG использовалась плазма пациента с СКВ, полученной после плазмафереза. IgG выделяли и хроматографировали на катионах металлов Cu(II), Ca(II), Mg(II), Zn(II) и Mn(II). Собирались различные фрак-

ции свободного объема (элюент – физиологический раствор, фракции 1 и 2), затем матрица обрабатывалась раствором 1М NaCl (фракция 3) и далее проводилась окончательная элюция 0.1М раствором ЭДТА (фракция 4). Пробы диализовались против физиологического раствора и тестировались на различные виды абзимной активности в присутствии соответствующих катионов.

Для гиалуронидазной, а также БАПНА-амидазной активности не удалось обнаружить существенных отличий в абзимной активности между фракциями одного препарата IgG, различно взаимодействующих с МХХ-матрицей. Возможно, это было обусловлено и невысокой исходной абзимной активностью препарата. После хроматографии концентрация IgG в препаратах снижается, что уменьшает абзимную активность ниже порога определения.

Тем не менее выяснено, что для некоторых реакций (например пероксидазной) удельная активность фракций IgG значительно возрастает после проведения МХХ [19]. Это увеличение зависит от степени избирательности взаимодействия IgG с соответствующим сорбентом. Если после сорбции на катионах меди удельная активность IgG увеличилась лишь в несколько раз для фракции IgG, задерживающейся на сорбенте ($1,1 \cdot 10^{-4}$ УЕ/мкг IgG против $4,3 \cdot 10^{-5}$ УЕ/мкг для исходных нефракционированных IgG, рис. 20), то для катионов магния удельная активность выросла на несколько порядков ($1,04 \cdot 10^{-2}$ УЕ/мкг IgG) и вся активность препарата IgG была связана именно с этой фракцией (рис. 21).

Рис. 20. Распределение пероксидазной активности в элюатах при МХХ на колонке с Cu(II)

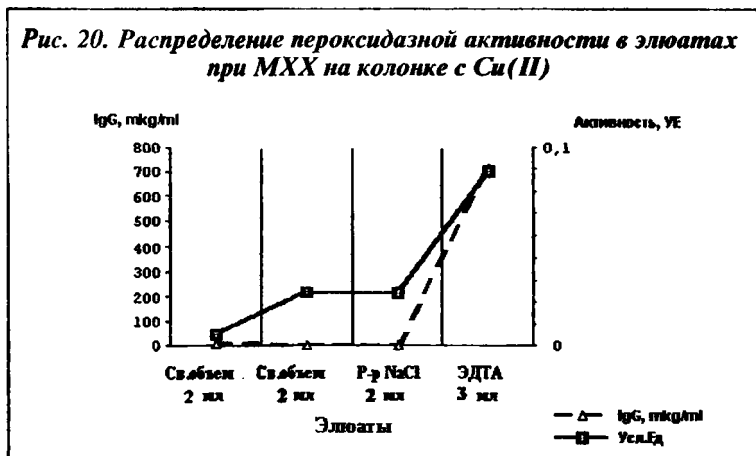
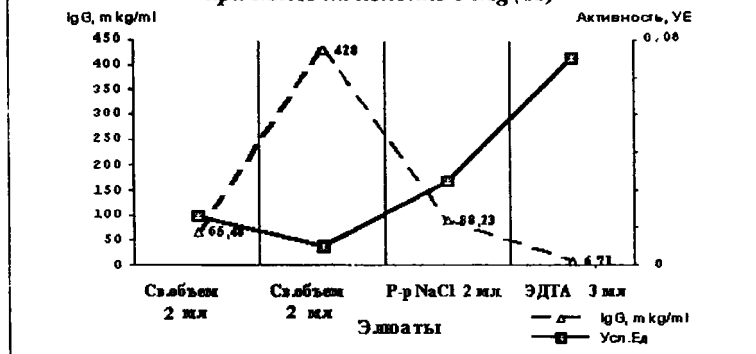


Рис.21. Распределение пероксидазной активности в элюатах при МХХ на колонке с Mg(II)



Вышеприведенные эксперименты подтверждают возможность обогащения препарата каталитических поликлональных IgG с помощью металло-хелатной хроматографии. Этот подход может быть использован и в дальнейшем для получения поликлональных каталитических АТ для биотехнологических и медицинских целей.

Таким образом, при взаимодействии катионов металлов с препаратами поликлональных IgG может происходить индукция или усиление их собственной каталитической (абзимной) активности. Последнее особенно характерно для поликлональных ИГ больных аутоиммунными заболеваниями. Это представляется закономерным, поскольку при аутоиммунных заболеваниях (а также патологических процессах инфекционной и опухолевой природы) значительно увеличивается продукция аутоантител самых разных специфичностей, в том числе способных к взаимодействию с катионами металлов.

Каковы возможные механизмы данного взаимодействия и чем определяется его избирательность?

Сам ИДК-силикагель представляет собой катионообменник [274]. Тем не менее сорбция IgG на матрице без металла была весьма незначительной. Вероятно, это связано с тем, что отмывание проводилось 1М NaCl, успешно разрушающим ионные взаимодействия. В этих условиях сама матрица на связывание Me-IgG практически не влияет. Кроме этого, такая обработка способствовала дополнительному увеличению специфичности взаимодействия, т.к. в работе [239] показано, что с повышением pH до нейтральных значений взаимодействие “белок-Me” усиливается, а специфичность его снижается.

Все использованные в работе катионы металлов переходных валентностей (кроме цинка) имеют частично незаполненную 3d-орбиталь, свободные ячейки которой могут участвовать в образовании координационных связей с лигандами [340]. С другой стороны показано, что в молекуле IgG достаточно структурных мотивов, способных координироваться с металлами, в первую очередь остатков цистеина и имидазольных колец гистидина [56].

Цистеин присутствует во всех молекулах IgG. В области талии молекулы он наиболее доступен внешнему взаимодействию, причем в среднем один сульфгидрильный остаток на молекулу IgG обычно является восстановленным [226]. Гистидиновые остатки локализованы преимущественно в константном участке цепей ИГ. Отсюда взаимодействие катионов металла с ИГ по цистеину и гистидину является менее избирательным.

Однако эти остатки могут оказаться в гипервариабельном участке за счет соматической мутации [290]. Тогда связывание ИГ-Ме может быть высокоспецифичным. В свою очередь остатки глутаминовой кислоты достаточно часто локализованы именно в вариабельных областях ИГ.

Из полученных результатов следует, что максимальное количество IgG взаимодействует с катионами Cu (II). Эти результаты сходны с полученными [54, 55], причем в этих работах показано, что практически все молекулы IgG способны к взаимодействию с катионами меди в той или иной степени.

Некоторое отличие в оценке количества IgG, связывающего катионы меди, может быть объяснено тем, что оценка взаимодействия "ИГ-Ме" проводилась нами в среде, содержащей 1 M NaCl. Кроме этого, интересным является еще одно предположение, связанное с тем, что в работе использовался объединенный препарат IgG от многих доноров. В исследовании [279] показано, что пулированный донорский препарат IgG содержит до 60-70% димерных комплексов "идиотип-антиидиотип". Не исключено, что в таких комплексах структуры, ответственные за связывание с катионами металлов, становятся менее доступными. Косвенным подтверждением этого предположения служит тот факт, что при выделении препарата IgG от одного больного, доля взаимодействующих с катионами меди ИГ увеличивалась.

Способность к связыванию катионов металлов значительно

расширяет каталитический потенциал иммуноглобулиновых молекул. По полученным данным, максимально зависит от катионов ДНКазная и пероксидазная абзимная активность – большинство изученных препаратов требует для своей активности металлов-кофакторов. В свою очередь, лишь отдельные препараты с БАПНА-амидазным и гиалуронидазным действием для активации требовали кофакторов. Другие были активны и без присутствия катионов металла [19, 98].

Из полученных данных следует также, что абзимная активность IgG, выделенная от конкретного больного, может не совпадать с активностью другого препарата IgG, даже выделенного от больного с такой же патологией и с одной и той же формой заболевания. Может не совпадать в этом случае и активирующее действие катионов на такие IgG. Одна и та же абзимная активность IgG может быть активирована разными катионами у разных больных. Это представляется существенным, так как подобные АТ могут быть маркерами индивидуального течения заболевания, его вариантов и могут по-разному участвовать в патогенезе болезней.

Механизмы, по которым могут действовать различные виды абзимов, а также факторы, приводящие к индукции абзимогенеза в иммунном ответе, анализируются далее.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ПОЯВЛЕНИЯ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Из всех вышеприведенных результатов следует, что катализ биомолекул, осуществляемый антителами в условиях *in vivo*, является не столько единичным случайным процессом, периодически возникающим в иммунной системе, сколько достаточно распространенным иммунологическим явлением [258]. Подавляющее большинство авторов, отмечающих это обстоятельство, подчеркивает, что биологическая сущность данного явления и его роль как в развертывании иммунного ответа, так и в модуляции других гомеостатических функций организма пока неясна [48, 222, 312, 313].

В первую очередь анализа требуют генетические факторы, обуславливающие появление поликлональных каталитических АТ.

Работы в этом направлении лишь начинаются. В исследованиях [265, 298] выдвигается два основных вопроса – или одинаковая каталитическая специфичность возникает индуктивно (последовательность аминокислот в активных центрах таких АТ может быть разной, похожими будут лишь конформации активных центров и, возможно – распределение каталитически активных групп) – или определенная каталитическая специфичность кодируется ограниченным набором *germ-line*-генов, общих у большинства организмов данного вида.

На наш взгляд, оба этих варианта могут быть реализованы. P.G.Schultz и R.A.Lerner справедливо сравнивают процесс биологической эволюции энзимной специфичности с генерацией каталитической активности антител – своеобразной “эволюцией в онтогенезе”, где вместо естественного отбора выступает отбор иммунологический [234, 284]. На сходство процессов индукции АТ и эволюции ферментов указывают и работы [17, 206].

В свою очередь, из процесса эволюции ферментов уже хорошо известно, что сходная энзимная активность может существовать как благодаря различным изменениям исходного гена-предшественника (но с сохранением специфичности), так и вследствие “конвергентной эволюции” со случайным совпадением необходимых для катализа остатков аминокислот в активных центрах [286].

Подтверждает такой подход и анализ другого иммунологического явления – процесса образования так называемых аутоАТ [245], возникающих как в норме, так и при разнообразных патологических состояниях. Вопросы происхождения аутоАТ, поставленные в работе Р.А.Ибрагимова “Гены аутоантител” [40], во многом совпадают с уже упоминавшейся работой [265], касающейся абзимных АТ. Автору удалось показать, что подтверждаются все варианты создания генов аутоантител – как непосредственное использование V-*germ-line*-областей, так и их “созревание” после контакта с АГ в результате соматического гипермутагенеза.

Тем не менее, окончательный ответ может быть получен лишь после секвенирования множества наборов генных сегментов, кодирующих каталитические АТ.

Для некоторых абзимов такие эксперименты уже проведены. Они действительно показали, что абзимная функция ИГ может определяться как генами зародышевых линий, так и возникать вследствие соматических мутаций.

В частности, при анализе V(H)- и V(L)-последовательностей мАТ BV 04-01, проявляющего ДНКазную активность в присутствии ионов Mg, было выявлено, что абзимная активность кодируется germ-line-генами (Rodkey L.S. с соавт., 2000 г. [277]).

Аналогично, Г. Гололобов с соавт. [199] исследовали каталитическое АТ, обладающее ВИПазной активностью (т.е. антитело, способное гидролизовать вазоактивный интестинальный полипептид). При изучении структуры каталитического центра, локализованного в легкой цепи оказалось, что он сформирован каталитической триадой Asp1-Ser27-His93, что соответствует типичной структуре активного центра сериновых протеаз. Коды всех этих трех остатков были обнаружены в germ-line-V(L)-сегменте. Зрелая цепь отличалась от зародышевой 4 аминокислотными заменами, однако они не затрагивали активный центр ВИПазы. Различия в кинетических параметрах между исходным и конечным вариантами абзимной L-цепи были незначительными. Авторы приходят к заключению, что по крайней мере у части АТ каталитическая активность присутствует исходно, являясь неотъемлемой функцией ИГ, причем она определяется филогенетической эволюцией V(L)-генов, а не соматическим мутагенезом.

С другой стороны, существует много указаний на принципиальную важность даже единственной аминокислотной замены для проявления каталитической активности ИГ.

Например, одно из мАТ, катализирующих уже упоминавшуюся реакцию Дильса-Альдера, является продуктом соматического мутагенеза исходных генов зародышевой линии. При этом одна соматическая мутация, приводящая к замене серина в 91 положении легкой цепи на валин, вызывала значительное увеличение как аффинности, так и каталитической эффективности зрелого АТ [278].

Наконец, Charbonnier J.B. с соавт. [164] продемонстрировали структурную конвергенцию активных центров разных каталитических АТ, которые были индуцированы единственным стабильным аналогом переходного состояния. После оценки всего спектра продуцируемых АТ для дальнейшего исследования были отобраны каталитические ИГ. Рентгеноструктурный анализ подтвердил катализ по механизму стабилизации переходного состояния субстрата, а также выявил наличие обязательного для катализа тирозинового остатка в активных центрах всех АТ, несмотря на существенные различия в их конформации.

Каковы же наиболее вероятные причины, ведущие к пролиферации клонов клеток, продуцирующих абзимы?

Основные механизмы генерации каталитической активности АТ к настоящему времени хорошо изучены в экспериментах с моноклональными антителами. Однако возможность их реализации в условиях поликлонального иммунного ответа представляется неодинаковой. В биотехнологии для индукции каталитической активности МАТ наиболее часто используют метод иммунизации стабильным аналогом переходного состояния субстрата. В условиях *in vivo*, как представляется, такой механизм будет иметь меньшее значение, поскольку большинство возникающих АТ будет комплементарно иммуногену (его эпитопам), находящемуся в стабильном, а не переходном состоянии. Эти АТ будут прочно фиксировать антиген, и вероятность его биохимического превращения представляется достаточно низкой. Доля же каталитических АТ, возникающих в таких условиях, должна быть относительно небольшой. Данное положение косвенно подтверждается результатами анализа каталитической активности гибридных культур, полученных по методу иммунизации стабильным аналогом переходного состояния [196]. Тем не менее, следует отметить, что возникающие в таких условиях абзимы обладают, вероятно, наивысшей удельной каталитической активностью.

Кроме того, существует еще одна возможность появления в организме каталитических АТ по механизму иммунизации стабильным аналогом переходного состояния субстрата. Этот процесс может быть сходен с явлением “антигенной мимикрии” [170, 171, 186, 190]. В этом случае могут образоваться АТ, которые будут прочно связывать первичный иммуноген (аналог переходного состояния), а близкие с ним по строению молекулы (в том числе и аутоантигены) – превращать.

Другой механизм получения каталитических АТ базируется на том, что в качестве индуктора активности применяется антиген, имеющий эпитопы с выраженным зарядом. Такой иммуноген активирует клоны лимфоидных клеток, несущие в активных центрах своих рецепторов аминокислоты с противоположным зарядом. На этом подходе базируется, в частности, абзимный кислотно-основной катализ [110]. Представляется, что данный механизм весьма реален для индукции поликлональных каталитических АТ в организме. В частности, хорошо изучены “естественные” полиреактивные низкоаф-

финные АТ, обычно перекрестно взаимодействующие с высокомолекулярными полианионами (ДНК, фосфолипидами, гиалуроновой кислотой, хондроитин- и декстрансульфатом [81, 96, 150, 207]). Физиологическая функция таких АТ, постоянно присутствующих в организме в невысоких титрах, до конца не выяснена. Однако их количество значительно увеличивается при аутоиммунных заболеваниях, причем при некоторых из них (СКВ, антифосфолипидный синдром, РА) они являются ведущими в патогенезе [50, 51, 63, 66]. Полученные данные по абзимной активности подобных аутоантител позволяют предположить, что в физиологических условиях такие АТ могут выполнять роль достаточно эффективных факторов врожденного естественного иммунитета (возможно – антибактериального, поскольку основными поверхностными АГ микробов являются отрицательно заряженные полисахариды клеточной стенки и капсулы [37, 208]). С другой стороны, повышенная пролиферация клонов лимфоцитов с абзимной активностью может прямо вести к развитию аутоиммунных состояний. Как уже упоминалось, данный процесс может находиться под прямым генетическим контролем [313]. Кроме того, в этой же работе (Tawfik D. с соавт., 1995 г.) было продемонстрировано, что пик абзимной активности клонов В-клеток приходится на ранний контакт иммунной системы с антигеном. Это данные подтверждают предположение о связи абзимной активности с “естественными АТ”. При дальнейшей иммунизации происходит селекция и созревание высокоаффинных АТ, что обусловлено в основном соматическим гипермутагенезом. При этом суммарный уровень абзимной активности в отношении данного субстрата-антигена может значительно снижаться, однако резко увеличивается доля связывающих АТ с высокой аффинностью.

Еще 1 способ генерации каталитических АТ может быть обусловлен предложенным нами антиидиотипическим механизмом [42]. В условиях *in vivo* он может вносить дополнительный существенный вклад в появление каталитических АТ. Согласно теории “симметричной идиотип-антиидиотипической сети” [69, 217], АГ-связывающий сайт (паратоп) антиидиотипического АТ достаточно часто может обладать конформацией исходного АГ, индуцировавшего иммунный ответ [185]. Если в качестве такого АГ выступает фермент [100, 181], то антиидиотипическое АТ таким образом может копировать его структуру и свойства (в том числе и энзимные). Учитывая,

что в организме постоянно присутствуют “естественные” антиферментные АТ (в первую очередь против ферментов микробов – антистрептокиназа, антигиалуронидаза, антиДНКазы и т.д. [91, 93, 203]), возникающие изменения в идиотипической сети могут приводить к индукции каталитической активности.

Наконец, вышеизложенные варианты могут модифицироваться из-за воздействия поликлональных активаторов пролиферации иммунных клеток (например – митогенов) [105].

Все указанные механизмы и их комбинации могут быть реализованы и в здоровом организме. Однако наиболее вероятным представляется их развитие при различного рода патологических процессах.

Что же касается непосредственных механизмов протекания абзимных реакций, то как уже упоминалось, абзимы катализируют химические процессы по тем же принципам, что и истинные ферменты: стабилизация переходного состояния субстрата, сближение реагирующих группировок, снижение энтропии реагентов, сдвиг электронных плотностей химических связей и т.д. [157, 283]. Однако явление абзимного катализа изучается в основном на моноклональных абзимах. Механизмы же действия природных каталитических антител до сих пор детально не исследованы, вероятно, в первую очередь из-за гетерогенности поликлональных ИГ.

К настоящему времени наиболее изучено действие АТ, обладающих нуклеазной, а также протеолитической и пероксидазной активностью [57, 73, 159, 160].

Полученные данные свидетельствуют, что ДНКазные абзимы могут использовать разные механизмы действия.

То, что активность большинства препаратов требует катионов двухвалентного металла [99], свидетельствует в пользу кислотно-основного механизма реакции. В этом случае катион выступает в роли электрофильного катализатора – льюисовой кислоты. Вероятно, сходно с природными нуклеазами, катион связывается с двумя оксианион-фосфатами, частично нейтрализуя их общий отрицательный заряд. Тем самым создается возможность атаки фосфодиэфирной связи со стороны нуклеофильного гидроксил-аниона.

Относительная термочувствительность абзимов-нуклеаз свидетельствует в пользу того, что конформация молекулы IgG также играет важную роль в осуществлении катализа. Возможно, она необ-

ходима для точного позиционирования катиона металла в активном центре.

Однако предполагаемый кислотно-основной механизм катализа может обеспечиваться не только катионами металлов и даже быть не единственным.

В пользу этого говорят полученные данные о наличии 2 оптимумов рН некоторых препаратов. Кроме того, часть препаратов проявляет достоверную ДНКазную активность в отсутствие катионов металла в определяемых концентрациях. Вместо катионов металла у таких ИГ в роли общекислотного катализатора может выступать имидазольное кольцо гистидина.

Эти результаты подтверждаются данными [15, 34, 95]. Если первоначально утверждалось, что абзимы-ДНКазы являются строго Mg- и Mn-металлозависимыми [15, 82], то впоследствии оказалось, что активность может быть самой многообразной. Препараты АТ, выделенные из молока, максимально активировались ионами цинка, а некоторые не требовали катионов и более того – активировались ЭДТА. Соответственно, и сорбция катионов на ионообменниках также ускоряла реакцию.

Кроме того, можно предположить, что ДНКазные абзимы способны уменьшать энтропию реакции. Показано, что АТ, направленные к отрицательно заряженным полианионам, несут в активных центрах положительный заряд [113]. Тем самым они прочно в нескольких точках связываются с ДНК, ограничивая подвижность субстрата и вызывая “растяжение” его связей. Такие взаимодействия будут чувствительны к хаотропному действию ионов, что и было продемонстрировано – активность снижается с повышением ионной силы.

Комплексный характер катализа был подтвержден экспериментом на моноклональных АТ [175, 277]. Оказалось, что для выбранного клона абзимопродуцирующих гибридом катализ протекает за счет эффектов напряжения (strain) субстрата и координации катиона Mg в активном центре АТ. Координационный сайт для ионов магния был представлен остатками тирозина и гистидина легкой цепи АТ.

Субстратная специфичность абзимов-нуклеаз (на примере РНКазной активности) существенно разнилась как между отдельными препаратами ИГ, так и в сравнении с природными РНКазами

[82]. Авторы приходят к выводу о многообразии проявлений абзимного катализа.

К сходным выводам можно также прийти, анализируя потенциальные механизмы протеолитического действия антител.

Структурные мотивы, указывающие на то, что ИГ “запрограммированы на протеолиз”, были обнаружены еще в 1975 г. [184]. Авторы показали, что последовательность районов CDR-I некоторых L-цепей весьма сходна со строением активных центров сериновых протеаз. Механизм действия последних к настоящему времени подробно изучен [65, 286]. Реакция протекает с образованием ацилферментного серинового интермедиата. Каталитическая триада активного центра Asp102-His57-Ser195 стабилизирует тетраэдрический переходный комплекс, включающий карбонильный углеродный атом.

Для моноклональных абзимов такой механизм в настоящее время считается доказанным. Guo J. с соавт. [237] с разрешением до 2.5 Å провели структурный анализ семейства каталитических АТ с эстеразной активностью. В активном центре наиболее активного абзима содержались серин и гистидин (каталитическая диада), аналогичная триаде “серин-гистидин-аспарагин” сериновых протеаз. Следующее по активности МАТ отличалось от первого 9 точковыми мутациями в тяжелой цепи, причем непосредственно в области активного центра вместо нуклеофильного серина содержался глицин. По данным трехмерного компьютерного моделирования конформация активных центров обоих АТ была схожей. Однако механизм катализа во втором случае не был нуклеофильным (еще одно доказательство многообразия каталитического действия АТ).

То, что поликлональные IgG-абзимы могут функционировать подобным образом, в первую очередь подтверждается использованным для оценки абзимного протеолиза субстратом, в образовании амидной связи которого участвует аргинин – излюбленный остаток для катализа сериновыми протеазами.

Эти данные подтверждаются результатами работ [247, 312] с одним важным уточнением: по результатам этих авторов, для более эффективного абзимного протеолиза аргинин атакуемой связи должен входить в состав короткого олигопептида.

Из этого, вероятно, следует, что существенной для этой реакции является и конформационная подвижность пептида, позволяющая ему эффективно приспосабливаться к активному центру абзи-

мов. Возможно также, что связывание с субстратом должно осуществляться на более протяженном участке.

Тем не менее, другие полученные данные указывают, что для некоторых абзимов для проявления действия все-таки необходимы ионы металлов. В этом случае реакция может протекать по механизму, сходному с действием металлопротеаз: координированный в абзиме металл стягивает на себя электроны карбонильной группы, поляризуя карбонильный углерод и увеличивая возможность нуклеофильной атаки со стороны молекул воды [182, 324].

Наконец, существует еще один вариант абзимного протеолиза, связанного с участием остатков цистеина. В этом случае восстановленная SH-группа может выступать в роли нуклеофила при гидролизе пептидной связи. Такой механизм действия не следует из полученных нами данных – тогда, учитывая инвариантность восстановленных остатков цистеина, активность наблюдалась бы практически во всех препаратах ИГ. Однако наши эксперименты проводились при нейтральном pH. В работе же [71] зарегистрирован аутокатализ иммуноглобулиновых молекул (вероятно при участии цистеиновых остатков) при низком pH, и он наблюдался у большинства выделенных препаратов. Это подтверждает возможность такого механизма.

Что касается абзимов с гиалуронидазной активностью, то их механизм вряд ли совпадает с действием гиалуронидаз организма человека – лизосомальной и тестикулярной, учитывая обнаруженное различие в оптимуме pH. Он может быть схожим с активностью микробных гиалуронидаз [38].

Другой способ катализа – кислотно-основной – здесь также возможен, учитывая зависимость активности некоторых препаратов от катионов двухвалентных металлов.

Наконец, механизм действия IgG с пероксидазной активностью должен отличаться от вышеописанных. Известно, что ферменты-оксидоредуктазы весьма часто содержат в качестве кофакторов или в составе простетических групп катионы металлов переходных валентностей, причем в пероксидазы входят ионы железа или меди [135]. Они координируются остатками гистидина, метионина, а также могут образовывать ковалентные кластеры с атомом серы остатка цистеина.

По нашим данным, в отсутствие катионов IgG проявляют слабую пероксидазную активность, вероятнее всего не связанную с Fab-фрагментом IgG, причем активность достоверно не отличалась у

больных и здоровых лиц. Это может свидетельствовать в пользу участия остатков цистеина шарнирных участков в катализе.

Кроме того, эти остатки могут связывать ионы меди. Исходя из полученных результатов, большинство IgG в комплексе с Cu(II) ускоряют пероксидазную реакцию, однако ускорение ее невелико. Последнее обстоятельство свидетельствует в пользу того, что координация катиона в этом случае не является самой оптимальной для протекания реакции.

Эти результаты в целом соответствуют данным работ [56, 57, 58], где изучалась другая оксидоредуктазная система – дисмутации и генерации супероксиданиона. В экспериментах подтверждается участие цистеина (за счет циклического восстановления-окисления тиоловых групп) и катионов цинка (или меди) в этой реакции, причем идиотипические АТ действовали противоположно антиидиотипам при дисмутации супероксида.

Однако иная картина наблюдается при проведении пероксидазной реакции в присутствии ионов Mg. Результаты металло-хелатной хроматографии показали, что с адсорбированной на колонке минимальной фракцией IgG (около 1% от общего IgG-препарата) связана практически вся абзимная активность. Это указывает на достаточно высокую специфичность связывания. Катион Mg(II) не имеет переменной валентности. Не исключено, что он участвует в катализе, способствуя организации активного центра для окислительно-восстановительной реакции. Такое возможно, например, для хиральных аналогов краун-эфиров [180].

Наличие различных механизмов абзимных окислительно-восстановительных процессов, в том числе и пероксидазных, подтверждается исследованиями и с применением моноклональных абзимов [111, 251, 299].

В целом вся совокупность проанализированных данных подтверждает множественность механизмов осуществления абзимных реакций. С одной стороны, они способны превращать самые разнообразные субстраты, с другой – осуществляют это различными способами и их комбинациями [303, 315].

Отсюда очевиден тот интерес, проявляемый к абзимам как к новому классу катализаторов для химии, биотехнологии и медицины, который не ослабевает с момента появления первых каталитических моноклональных АТ [325]. Различные аспекты применения поликлональных абзимов для этих целей приведены ниже.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В КАЧЕСТВЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Теоретические исследования в области абзимного катализа послужили толчком к обширным разработкам по практическому применению абзимов, в первую очередь – для медицинских и биотехнологических целей.

Однако к настоящему времени обнаружились и основные недостатки, свойственные антительному катализу – обычно меньшая каталитическая эффективность в сравнении с истинными ферментами (свойственно большинству абзимов) и дороговизна.

Хотя утверждается [284], что моноклональные абзимы можно получить в количестве до нескольких граммов, тем не менее такой выход катализатора представляется недостаточным как для промышленного катализа рутинных процессов, так и для массового применения абзимов в качестве терапевтических средств. Как уже упоминалось выше, наиболее часто моноклональный антительный катализ используют для реакций, которые невозможно, трудно или дорого проводить иным способом. Либо это ассиметрический (хиральный) синтез [108, 284] с выходом одной формы рацемата с 95%-99% чистотой (особенно важно в синтезе антибиотиков и других лекарственных препаратов), либо катализ реакций с получением весьма дорогостоящих продуктов (биологически активных пептидов и других биорегуляторов). Усилия направляются также на создание абзимов-антикоагулянтов [253], детоксикантов, средств для предтрансплантационной обработки костного мозга, иммунотерапии онкологических заболеваний [127, 230, 266]. Многие из исследований по вышеперечисленным тематикам являются закрытыми [83].

Кроме того, отчетливо проявилась еще одна особенность, присущая абзимному катализу – неопределенная вероятность получения катализатора с заданными характеристиками. Поэтому предлагается анализировать на активность после иммунизации все антитела, т.е. проводить сплошной скрининг их абзимной активности [83]. Как утверждает основоположник абзимного катализа Р.А.Лернер: "...следует изучать все антитела, поскольку могут быть важные нюансы, которые не столь изучены, чтобы их заранее учесть." И далее сравнивает получение высокоэффективных каталитических антител

с игрой в рулетку: “В казино есть разница – доллар у вас в кармане или 10 тысяч”[83].

Поэтому для удешевления процедуры и увеличения набора исходных специфичностей все чаще применяется метод клонирования комбинаторных библиотек L-цепей иммуноглобулинов (например, в библиотеке фаговых векторов). Это позволяет получить сотни тысяч вариантов для последующего анализа, что, тем не менее, по-прежнему остается дорогим биотехнологическим решением [196].

Отсюда все более пристальное внимание привлекается к поликлональному антительному катализу [107, 134]. Оказалось, что поликлональные каталитические АТ закономерно возникают в ходе иммунизации и могут быть выделены и использованы [160, 201, 296]. Это гораздо более дешевый вариант с потенциально более высоким количественным выходом абзимов в сравнении с моноклонами [296, 297].

Однако наиболее существенным препятствием в использовании таких абзимов является их гетерогенность. Лишь небольшая часть процента (в лучшем случае – несколько процентов) АТ из общего пула обладают каталитической активностью. Суммарная каталитическая активность препарата АТ оказывается малой. До настоящего времени предлагалось весьма ограниченное число способов обогащения каталитически активных фракций поликлональных IgG. Основной из них – аффинная хроматография поликлонального абзима на гаптене-субстрате (или аналоге субстрата), которым производилась иммунизация. Это дорогой процесс, который в каждом случае требует приготовления отдельной аффинной антигенной матрицы [265]. Кроме того, оказывается, что высокая аффинность к гаптене-иммуногену и каталитическая эффективность абзима весьма часто не совпадают [311]. Отсюда при использовании вышеприведенного способа большая часть АТ лишь связывает, а не катализирует антиген [82].

Нами продемонстрирована возможность обогащения каталитически активных фракций иммуноглобулинов G путем их металлохелатной хроматографии на силикагеле с привитой иминодиуксусной кислотой, который может быть связан с катионами Cu(II), Ca(II), Mg(II), Zn(II), Mn(II) и потенциально многими другими. Методика является, несомненно, более дешевым вариантом обогащения каталитических поликлональных IgG, так как химически устойчивая

матрица может быть использована многократно без существенного снижения активности.

Кроме того, данный способ лишен еще одного недостатка, который присущ методу очистки каталитических IgG на иммуногенесубстрате – возможности разрушения привитого к матрице субстрата самими выделяемыми антителами.

Эти результаты получены с использованием IgG, выделенных либо от доноров крови, либо от больных аутоиммунными заболеваниями. Прямое использование таких катализаторов в биотехнологии и медицине затруднительно по нескольким причинам. Во-первых, IgG, даже катализирующие один и тот же тип реакций, но выделенные от разных больных, существенно отличаются по своим каталитическим характеристикам. Данный факт подтверждается нашими и литературными данными [73, 82]. Следовательно, их весьма трудно стандартизовать. Во-вторых, источник получения таких IgG весьма ограничен (ИГ могут быть выделены лишь в малом количестве). В качестве первичного материала возможно использовать плазму после плазмафереза у больных аутоиммунными заболеваниями (ее количество достигает 1-2 литров), которая обычно никак не утилизируется. Однако подобные процедуры проводятся нерегулярно.

В большем количестве можно получать плазму доноров, однако донорские IgG обладают минимальной каталитической активностью.

Отсюда представляется, что дальнейшие исследования поликлональных АТ как потенциальных биокатализаторов могут проводиться с использованием нескольких основных подходов.

Наиболее реальным для практического применения является разработка новых схем и методов проведения традиционной иммунизации с целью получения абзимно активных поликлональных антител.

Одной из первых работ в этом направлении является исследование Gallacher G. с соавт. [194]. Ими в течение двух лет осуществлялась программа по иммунизации овец гаптенами, конъюгированными с гемоцианином виноградной улитки. Основное структурное отличие в строении гаптенов заключалось в анионной группировке (гидрофосфат и сульфон, соответственно). У всех 13 животных, иммунизированных гаптеном, содержащим гидрофосфат, были обнаружены каталитические АТ, в другой группе, равно как и в контроль-

ной группе неиммунизированных овец, абзимной активности обнаружено не было. По мнению авторов, ими было получено первое доказательство того, что появление каталитических АТ является обычным, если не рядовым, событием при разворачивании иммунного ответа.

Недавние эксперименты Stephens D.B. с соавт. по иммунизации лабораторных животных (кроликов) гаптенами для получения поликлональных абзимов показали, что при гипериммунизации у большинства животных, взятых в опыт, возникают высокоэффективные каталитические АТ, превращающие гаптен [265]. В качестве иммуногена использовали трис(4-метоксифенил)-6-карбоксифенилфосфония бромид – аналог переходного состояния субстрата для реакции гидролиза 4,4г,4г-триметокситритилового эфира. Ферментативная (трителизная) активность полученных поликлональных IgG не уступала моноклональным абзимам, катализирующими эту же реакцию. Кроме того, неожиданным оказалось то обстоятельство, что АТ, выделенные от разных животных, обладали весьма сходными каталитическими характеристиками (K_M и k_{cat}).

С учетом полученных данных D.B. Stephens провел компьютерное моделирование каталитических параметров препаратов поликлональных абзимов. Были изучены характеристики суммарного пула различных по активности катализаторов, подчиняющихся кинетике Михаэлиса-Ментен. При этом учитывалось разное сродство компонентов пула к конкурентному ингибитору. Моделировалось как нормальное распределение характеристик пула катализаторов, так и скошенное (отрицательно скошенное распределение Вейбулла). Считается, что скошенное распределение отражает преобладание в пуле ИГ молекул с более высоким сродством к АГ (в отличие от нормального распределения). Последнее явление действительно наблюдается в условиях *in vivo*, когда происходит преимущественная селекция клонов, высокоаффинных к антигену.

За медиану распределений значений параметров принимались уже известные экспериментальные значения, характеризующие каталитическую активность препаратов поликлональных IgG.

Моделировались следующие параметры катализа: k_{cat} – центрировалась на уровне 0.1 min^{-1} , изменялась от 0.00001 min^{-1} до 1000 min^{-1} ; K_M – центрировалась на уровне 20 мкМ, варьировала от 2 нМ до 200 мМ, т.е. на 4 порядка от среднего значения в обе стороны.

Концентрация субстрата [S] менялась в диапазоне 5-150 mM, что также соответствует полученным экспериментальным данным.

В результате проведенного компьютерного анализа автор пришел к следующему выводу: параметры суммарной каталитической активности гетерогенного препарата IgG отличаются не более, чем на порядок от параметров, характеризующих наибольшую в данном пуле гомогенную популяцию катализаторов.

Из результатов данной работы также следует, что при выборе оптимальной стратегии иммунизации возможно получение различных препаратов поликлональных ИГ, обладающих, однако, сопоставимыми каталитическими характеристиками. Это обстоятельство облегчает их стандартизацию.

Такое направление представляется перспективным. Оно требует тщательного подбора иммуногена по механизму катализируемой реакции, а также разработки эффективной схемы иммунизации. Полученные АТ можно обогащать, в том числе используя метод металло-хелатной хроматографии. В первую очередь необходимо исследовать важные в практическом отношении реакции, например сайт-специфический протеолиз или аналогичный гидролиз нуклеиновых кислот.

Важность выбора протокола иммунизации, учет даже минимальных различий в структуре иммуногена для индукции абзимной активности подтверждаются результатами работы Odenbaugh A.L. с соавт. [251]. Ими была изучена система, состоящая из 12 родственных по структуре гаптенов (фосфатов и фосфонатов). Результат иммунизации животных на 3 разных моделях показал хорошую воспроизводимость и, по мнению авторов, оказался весьма неожиданным. При иммунизации одним из вариантов гаптена, содержащем фенильный радикал с противоположной от линкера стороны, индуцировалась выраженная абзимная ацилгидролазная активность во всех модельных системах. Другие модификации гаптенов, содержащие в данном месте преимущественно бензильный радикал, были лишены каталитической активности, или активность была слабой. Авторы указывают на принципиальную важность учета тонких особенностей в структуре исходной молекулы, подвижности иммуногена, свойств уходящих группировок и т.д.

При учете вышеизложенного, каталитические АТ могут стать более дешевой альтернативой моноклональным абзимам.

Кроме того, многими исследованиями [55, 56, 271] показано, что АТ могут связывать каталитические кофакторы (например – ионы металлов) по константным участкам ИГ с сохранением и усилением катализа. В этом случае можно соединять многочисленные эффекторные (в том числе транспортную) функции АТ с каталитической активностью. Такой препарат можно получать в большом количестве.

Наконец, до настоящего времени практически не изучено возможное образование каталитических АТ в ответ на проведение вакцинации. В этом случае иммуногеном являются вакцинные штаммы или анатоксины возбудителей, вызывающих наиболее распространенные инфекции. От специально подобранных доноров получают противокоревой, противогриппозный, антистафилококковый и др. гамма-глобулины. Высокоэффективным препаратом в лечении многих заболеваний (септические состояния, тромбоцитопеническая пурпура, первичные и вторичные иммунодефициты) является донорский иммуноглобулин для внутривенного введения [114, 322]. Механизм его действия до сих пор точно не выяснен. В случае обнаружения в таких препаратах ИГ каталитических антимикробных и особенно – противовирусных АТ, их можно будет концентрировать (в частности – применяя металло-хелатную хроматографию) для последующего изучения лечебного действия.

Наиболее вероятно, что оптимальным для практических целей станет комбинирование всех вышеизложенных способов генерации моно- и поликлональных каталитических АТ с индивидуальным решением каждой конкретной задачи.

Подобные подходы уже реализуются. Так, в исследовательском иммунохимическом терапевтическом центре (Chemical Immunology and Therapeutics Research Center – CITRC), созданном при Техасском университете, развернут широкий цикл международных кооперативных исследований по изучению и практическому применению моно- и поликлональных каталитических антител.

В частности, под руководством Г.Гололобова, S.Paul и A. Tramontano проводится разработка каталитических АТ для профилактики ВИЧ-инфекции, а также создание новых вакцин-иммуногенов, приводящих к индукции высокоэффективных каталитических АТ против ВИЧ. В частности, показана способность АТ действовать на протеин gp41 вируса иммунодефицита человека.

Изучается влияние абзимов на гемостаз. Показано, что легкие цепи ИГ, выделенные от больных миеломной болезнью, способны вызывать сайт-специфический протеолиз протромбина. Это приводит к активации процесса свертывания крови и потенциально может служить причиной тромбоэмболических осложнений (Thiagarajan P. с соавт., 2000 г. [306]).

С. Jagannath с сотр. разрабатывают терапевтические каталитические АТ, мишенью для которых стали ферменты, ответственные за синтез димиколата трегалозы – одного из главных факторов вирулентности *M. tuberculosis*.

Разрабатываются подходы к использованию каталитических АТ для иммунотерапии опухолей. Они будут направлены к опухолевым антигенам.

Наконец, в исследованиях A.Dasgupta, S.Paul и J.Clark изучается роль каталитических АТ в реакции отторжения трансплантата.

В целом биотехнологические приложения представляют собой весьма важную область использования поликлональных каталитических АТ. Однако не менее важной в практическом отношении является оценка абзимной активности при развертывании иммунного ответа в условиях *in vivo* – в норме или при различных патологических процессах [78].

АБЗИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Анализ всего вышеизложенного приводит к заключению, что индукция антител, обладающих каталитической активностью, является закономерным компонентом развивающегося иммунного ответа. К настоящему времени доказана каталитическая активность АТ в отношении наиболее физиологически важных субстратов – белков и нуклеиновых кислот [257, 258].

Тем не менее большинство полученных результатов лишь подтверждает сам факт существования абзимов *in vivo*. Спектр изученных катализируемых реакций достаточно ограничен. Недостаточно исследована роль каталитических антител с одной стороны как возможных факторов поддержания иммунологического статуса орга-

низма, с другой – как возможных индукторов патологических процессов [22, 23].

Отсюда в последнее 5-летие появляется все больше работ, посвященных сравнению определенных видов абзимной активности при различных патологических процессах.

В частности, Kalaga R. с соавт. [312] осуществили скрининг АТ здоровых лиц и больных с суставной патологией (деформирующим остеоартрозом и ревматоидным артритом) на наличие протеолитической активности. Ее удалось обнаружить в каждом исследованном образце и доказать ее принадлежность к фракции IgG. Исследователи приходят к заключению о широкой распространенности каталитических АТ в организме, однако функция их пока неясна.

В работах [35] и [178] отражены данные, касающиеся ДНКазной абзимной активности при некоторых патологических процессах. В последней, в частности, проанализированы взаимосвязи между ДНКазной абзимной активностью и особенностями лимфопролиферативных заболеваний. Было выявлено, что такая активность наблюдается при пролиферации зрелых В-клеток и отсутствует при злокачественных лимфатических и Т-клеточных опухолях, а наличие аутоиммунных нарушений, сопутствующее лимфопролиферативным заболеваниям не является необходимым условием для продукции каталитических АТ.

Барановский А.Г. с соавт. изучили уровни нуклеазной активности при гриппе, туберкулезе, пневмонии, лейкозах и вирусных гепатитах [33]. В последней группе уровень нуклеазной активности оказался наивысшим. Власов А.В. с соавт. в 1999 г. [73] провели сравнительную оценку ДНКазной и РНКазной активностей абзимов при аутоиммунных заболеваниях (аутоиммунном тиреоидите (АИТ), СКВ, РА).

Кит Ю.Я. с соавт. [48, 222] выявили протеинкиназную активность секреторного IgA, выделенного из молока рожениц. АТ катализировали в присутствии АТФ фосфорилирование сериновых остатков казеина (но не гистонов). Повышенным сродством к субстрату обладали цепи самого ИГ, а не его секреторного компонента. Оптимальные условия реакции не совпадали с описанными для известных протеинкиназ. Подчеркивается, что впервые в условиях *in vivo* обнаружены ИГ, ускоряющие реакцию синтеза. Авторы заключают, что "...классические представления о функции антител в живых организмах могут быть со временем существенно пересмотрены."

Нами с 1987 года проводятся исследования по изучению каталитической активности препаратов поликлональных IgG при аутоиммунных, вирусных и онкологических заболеваниях.

Проводилась комплексная оценка ДНКазной, гиалуронидазной, БАПНА-амидазной и пероксидазной активности препаратов IgG у больных серопозитивной и серонегативной формой ревматоидного артрита, СКВ, вирусными гепатитами В и С, раком желудка, толстого кишечника, прямой кишки, легкого, аутоиммунными и опухолевыми заболеваниями щитовидной железы (диффузным токсическим зобом, аутоиммунным тиреоидитом, подострым тиреоидитом, узловым токсическим зобом, раком щитовидной железы), а также контрольной группы доноров крови.

Была проведена оценка уровней различных видов абзимной активности, а также выполнен корреляционный анализ абзимной активности препаратов IgG с другими признаками заболеваний.

Проведенные эксперименты показали, что препараты IgG, выделенные из крови больных ревматоидным артритом, СКВ, различными формами БА, вирусными гепатитами и некоторыми формами онкологических процессов, способны проявлять абзимную активность, причем ДНКазная, БАПНА-амидазная и гиалуронидазная активность в большинстве случаев превышает таковую в контрольной группе доноров, а пероксидазная активность больных достоверно не отличалась от активности контрольной группы, за исключением больных с патологией щитовидной железы [19, 26, 88, 195].

То, что абзимная активность больных превышает таковую в контрольной группе, не является неожиданным. Активация общего и местного иммунного ответа эндо- и экзогенными АГ протекает значительно интенсивнее у больных аутоиммунными и вирусными заболеваниями. Кроме того, у больных происходит постоянный цитолиз разной степени выраженности, сопровождающийся воспалением с продукцией цитокинов [50, 86]. Все это увеличивает вероятность пролиферации абзим-несущих клонов.

Тем не менее, минимальный уровень абзимной активности обнаруживается и у доноров. Это представляется естественным, т.к. набор покоящихся В-клеток у разных индивидуумов в целом является сходным [40]. Достаточно выраженная абзимная протеолитическая активность контрольной группы наблюдалась, например, в работе [312]. При исследовании нуклеазных абзимов также была

обнаружена незначительная нуклеазная активность донорских ИГ. В связи с этим авторы работы [73] высказали предположение о потенциальной неоднородности контрольной группы доноров.

Что касается пероксидазной активности, то отсутствие различий между опытными и контрольными группами объяснимо с учетом принадлежности активности, вероятнее всего, Fc-фрагменту IgG, что свидетельствует о меньшей специфичности данной реакции.

Сравнение уровней абзимной активности при различной патологии выявляет следующее: наиболее выражено абзимное действие проявляется при аутоиммунных заболеваниях или болезнях, имеющих существенный аутоиммунный патогенетический компонент.

По нашим данным, повышенные уровни ДНКазной абзимной активности выявляется при аутоиммунном тиреоидите, СКВ, далее следуют вирусные гепатиты В и С. В целом эти результаты подтверждаются данными [33], где высокий уровень ДНКазной активности обнаружен при вирусных гепатитах.

Здесь следует обязательно обратить внимание еще на одно обстоятельство: и при вирусных гепатитах, и при аутоиммунном тиреоидите назначаемое лечение прямо не затрагивает иммунную систему (исключая терапию альфа-интерфероном при гепатитах). Глюкокортикоиды (ГКС) назначаются непостоянно и обычно в небольших дозировках.

В свою очередь, при диффузных болезнях соединительной ткани, особенно при СКВ, ГКС являются основой патогенетического лечения [223]. Все шире их используют и в лечении РА [29]. Отсюда для исследования весьма трудно подобрать группу исходно не лечившихся больных с ДБСТ (особенно с прогрессирующими или тяжелыми формами).

Не исключено, что без лечения ГКС уровень ДНКазной абзимной активности у больных ДБСТ был бы значительно выше.

Наконец, наиболее отчетливо различия в уровнях ДНКазной абзимной активности проявляются при заболеваниях щитовидной железы: уровень ДНКазной абзимной активности больных аутоиммунным тиреоидитом более чем в 2 раза превышает таковой у больных подострым тиреоидитом и раком щитовидной железы.

Все это подтверждает возможность применения абзимной активности для дифференциальной диагностики аутоиммунных заболеваний.

Обнаруженная гиалуронидазная активность, как и ожидалось, была самой высокой при изученных ревматических заболеваниях. Это представляется закономерным, так как поражение соединительнотканного матрикса, синовиальных оболочек и эндотелия сосудов является ведущим в патогенезе ДБСТ. При других изученных заболеваниях она либо не выявлялась, либо оказывалась минимальной.

Наибольшая амидазная активность абзимов выявлялась при аутоиммунном тиреоидите. Учитывая ранее сказанное, данный факт не является неожиданным – белковые “забарьерные” АГ щитовидной железы (в первую очередь, тиреоглобулин и тиропероксидаза) являются мощными индукторами специфического иммунного ответа [30, 47, 79]. Другие авторы также находили высокий уровень протеолитической активности АТ при данном заболевании [156].

При вирусной патологии (гепатитах) уровень БАПНА-амидазной активности оказался невысоким.

Помимо параметров, связанных с самим заболеванием, на уровень абзимной активности достоверно влияет проводимое лечение.

В первую очередь это относится к терапии аутоиммунных заболеваний глюкокортикостероидами.

В частности, при РА прием глюкокортикостероидов связан с достоверно более низким уровнем ДНКазной абзимной активности в сравнении с группой больных, принимавших метотрексат, хотя группы больных были сходными. С другой стороны, прием цитостатиков при РА подавлял другие виды активности (гиалуронидазную и БАПНА-амидазную) в сравнении с группами больных, лечившихся стероидами и нестероидными противовоспалительными препаратами.

Весьма сложно оценить природу потенциального ингибирующего воздействия кортикостероидов на ДНКазную абзимную активность. Механизм их действия чрезвычайно многообразен и до конца не изучен. Считается, что ГКС подавляют любой воспалительный процесс, увеличивая транскрипцию генов липокортина – блокатора фосфолипазы A_2 [97].

На продукцию ИГ они влияют опосредованно, подавляя пролиферацию субпопуляций лимфоцитов [50, 87]. Таким же действием обладает и метотрексат. Вероятно, этот механизм и является главным.

Однако при назначении сверхвысоких доз стероидов при пульс-терапии (до 1 г и более метилпреднизолона в сутки [66]), можно по

крайней мере предположить прямое подавляющее воздействие глюкокортикоидов на абзимную активность, что в предварительных исследованиях было показано нами в условиях *in vitro*.

В целом полученные данные указывают, что назначаемое лечение является весьма важным фактором, определяющим проявления абзимной активности при патологии.

ПРИЧИНЫ ПОЯВЛЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АТ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

С учетом увеличения абзимной активности при возникновении и развертывании клинической картины заболевания, возникает вопрос о возможных причинах индукции абзимной активности при патологических процессах различного происхождения.

Какие же виды АГ могут индуцировать образование соответствующих видов абзимов по вышеописанным механизмам?

Наличие аутоАТ к ДНК является показателем аутоиммунного процесса при СКВ. Как показано совсем недавно (Naripirei M. с соавт., 2000 г. [189]), основным патогенетическим процессом при волчанке является нарушение утилизации эндогенной ДНК с закономерной индукцией аутоАТ к нуклеопротейду. Часть таких АТ проявляет абзимную активность. Не исключается, что на первых этапах они могут играть приспособительную роль, разрушая избыток нуклеиновых кислот. Кроме того, в работе [250] показано, что ДНКазные абзимы могут реагировать не только с нуклеиновой кислотой, но и связанным с ней белковым матриксом. Это создает условия для одновременной индукции абзимов с протеолитической активностью.

Как уже упоминалось ранее, АТ к ДНК могут широко полиспецифично реагировать с другими полианионами – декстрансульфатом, гиалуроновой кислотой, хондроитинсульфатом, фосфолипидами [60, 121, 130, 197]. Отсюда следует, что любой из этих полианионов может вызвать как образование ДНКазных абзимов, так и абзимов, например с гиалуронидазным или липолитическим действием.

Наконец, при большинстве вирусных инфекций происходит активация иммунной системы нуклеопротейинами вирусного капсида. Также при обоих видах вирусной инфекции (как интегративной, так и продуктивной) происходит постепенный цитолиз

клетки – реципиента вируса – с выходом нуклеиновых кислот в лимфо- и кровоток.

Все вышеперечисленные процессы могут сочетаться, приводя к пролиферации абзимных клонов. Недаром до сих пор одной из наиболее актуальных остается теория вирусной индукции ревматических болезней (в первую очередь, РА и СКВ) [66, 84, 148].

АТ с протеолитическим действием могут быть индуцированы, в принципе, большинством белков-антигенов, вступивших в контакт с иммунной системой [120, 153, 209]. Характерным примером является обнаружение АТ, гидролизующих тиреоглобулин, при аутоиммунном тиреоидите [156, 162] или расщепляющих ВИП при бронхиальной астме [159]. В работе Г.Гололобова с соавт. указывается, что протеолитическая активность АТ кодируется germ-line-генами, причем протеолитические абзимы могут возникать в ответ на любой белковый иммуноген. Доказано, что нуклеофильные абзимы-протеазы могут функционировать по механизму, сходному с действием сериновых протеаз [199].

Все указанные виды специфичностей могут быть активированы также по антиидиотипическому механизму. Антигеном здесь служат эндо- или экзогенные ферменты. Наиболее вероятен данный вариант для гиалуронидазных абзимов (особенно с учетом нейтрального оптимума их рН), а также для пероксидазных, возникающих при аутоиммунных болезнях щитовидной железы [280, 281, 317]. В этом случае индуктором абзимогенеза становится еще один специфический эндоантиген – тиропероксидаза [141, 149, 224]. Возможно поэтому пероксидазная активность АТ таких больных превышает активность здоровых лиц.

Подобный механизм возможен и для ДНКазных, и для протеолитических абзимов, т.к. при процессах цитолиза в кровь попадают клеточные протеазы и нуклеазы. С применением корреляционного анализа продемонстрированы многочисленные взаимосвязи гидролитических ферментов, антител к ним, а также других параметров иммунной системы, например, при ревматических болезнях [181, 304].

Все эти результаты указывают на многообразие причин, вызывающих индукцию каталитически активных АТ, однако ведущим фактором в этом процессе вероятнее всего является природа антигена, определяющая особенности его взаимодействия с клетками иммунной системы.

АНАЛИЗ СВЯЗИ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ С ПРОЯВЛЕНИЯМИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Учитывая, что в норме абзимная активность весьма невелика, можно заключить, что она постепенно увеличивается по мере развития заболеваний, а следовательно – отражает происходящие изменения (или непосредственно в них участвует).

Связи между абзимной активностью и различными сторонами развивающихся патологических процессов можно проследить, основываясь на данных проведенного корреляционного анализа [19].

При проведении анализа методом Спирмена по всей группе больных ревматоидным артритом обнаруживаются значимые корреляции абзимной активности с другими признаками РА.

В первую очередь, здесь следует отметить наличие средней силы отрицательных связей между различными видами активности и концентрацией сывороточных ИГ. В частности, гиалуронидазная абзимная активность была отрицательно связана с уровнем сывороточных IgG ($r=-0,46$, $p<0,05$) и IgA ($r=-0,36$, $p=0,09$); БАПНА-амидазная – с уровнем IgM ($r=-0,43$, $p=0,08$).

Получены данные, указывающие на обратные взаимоотношения между абзимной активностью и степенью поражения почек при РА. Оказалось, что БАПНА-амидазная активность IgG обратно взаимосвязана с уровнем лейкоцитов мочи ($r=-0,53$, $p<0,01$) и уровнем белка мочи. Аналогично, обратная корреляция была найдена между БАПНА-амидазной активностью и уровнем мочевины сыворотки ($r=-0,41$, $p=0,15$).

Наконец, коррелятивный анализ подтвердил и вышеприведенные данные, касающиеся влияния лечения на уровень абзимной активности ИГ. Обнаружена средней силы положительная взаимосвязь между назначением гормонов при лечении РА и ДНКазной активностью IgG ($r=0,36$, $p<0,01$).

Сходные результаты были получены и после проведения коррелятивного анализа внутри различных подгрупп больных РА. Они касаются взаимосвязей видов абзимной активности с уровнем сывороточных иммуноглобулинов, со степенью поражения почек и т.д. В частности при серопозитивном РА связь между ДНКазной активностью IgG и назначением больному глюкокортикоидов и цитостатиков даже увеличилась по сравнению с общей группой больных ($r=0,52$, $p<0,001$).

Кроме того, в группе больных серопозитивным РА была обнаружена средней силы отрицательная взаимосвязь между гиалуронидазной активностью ИГ и стадией болезни ($r=-0,51$, $p<0,01$).

В группе больных РА, получавших цитостатическую терапию, обнаружена отрицательная корреляция между уровнем ревматоидного фактора и ДНКазной IgG-активностью ($r=-0,56$, $p<0,05$), а также гиалуронидазной активностью и возрастом больных ($r=-0,55$, $p=0,08$). Все это подтверждает связь абзимной активности с течением РА и тяжестью заболевания.

Корреляционный анализ, проведенный у больных СКВ, выявил во многом сходные зависимости в сравнении с больными ревматоидным артритом. В первую очередь, как и при РА, обнаружилось достоверные взаимосвязи между некоторыми видами абзимной активности и симптомами поражения почек (одного из основных синдромов) при СКВ. Так, гиалуронидазная активность IgG была отрицательно связана с количеством лейкоцитов ($r=-0,506$, $p<0,05$) и белка мочи ($r=-0,44$, $p=0,09$).

С другой стороны, ДНКазная активность позитивно коррелировала с признаками поражения почек при СКВ. Обнаружена средней силы позитивная связь ДНКазной активности с уровнем белка мочи ($r=0,4$, $p=0,11$) и с уровнем мочевины сыворотки ($r=0,66$, $p<0,05$).

Необходимо отметить, что БАПНА-амидазная ферментативная активность сыворотки (в отличие от соответствующей абзимной активности) демонстрировала положительную взаимосвязь с признаками поражения почек при СКВ (уровнем мочевины крови ($r=0,51$, $p=0,08$) и количеством белка мочи ($r=0,51$, $p=0,06$)).

Однако по сравнению с РА, при СКВ обнаружили дополнительные взаимосвязи между абзимной активностью и симптомами заболевания. Это касается печеночного синдрома СКВ. И здесь выявились отрицательные взаимосвязи между ДНКазной активностью и уровнем аспарагиновой трансаминазы ($r=-0,84$, $p<0,05$) и билирубина ($r=-0,61$, $p=0,06$). Сходным образом проявляла себя и БАПНА-амидазная активность IgG, хотя данные недостоверны. Сывороточная же ферментативная активность, наоборот, позитивно коррелировала с симптомами поражения печени при СКВ (данные статистически недостоверны, $p>0,05$).

БАПНА-амидазная активность IgG прямо коррелировала с

уровнем эритроцитов крови ($r=0,52$, $p<0,05$), а пероксидазная – обратно ($r=-0,75$, $p<0,01$).

Из других показателей анализа следует привести отрицательную взаимосвязь гиалуронидазной абзимной активности с уровнем лейкоцитов крови ($r=-0,55$, $p<0,05$) и, как следствие – с активностью заболевания (коэффициент корреляции $r=-0,49$, $p<0,05$). Сывороточная же ферментативная активность (в частности БАПНА-амидазная) была прямо связана с активностью процесса ($r=0,56$, $p<0,05$). ДНКазная абзимная активность была прямо связана с длительностью болезни ($r=0,48$, $p<0,05$).

Наконец, интересно отметить, что не было обнаружено достоверной корреляции между уровнями сывороточной ферментативной активности и соответствующей активности абзимов при данном заболевании.

В целом при анализе корреляционных отношений при ДБСТ обращает на себя внимание несколько обстоятельств. Во-первых, обнаруженная связь некоторых видов активности с концентрацией сывороточных ИГ была отрицательной. Не исключено, что при обострении заболевания, сопровождающегося усиленной выработкой ИГ, происходит селекция высокоаффинных клонов, уже не обладающих каталитической активностью.

Подобное прослеживается также при анализе корреляций абзимной активности с симптомами поражения почек при РА – уровень лейкоцитов, белка мочи и мочевины сывотки обратно связаны с уровнем БАПНА-амидазной абзимной активности. Последнее представляется важным, т.к. амилоидоз почек является одним из наиболее тяжелых осложнений длительно протекающего ревматоидного артрита. Отсюда не исключается определенная протективная роль абзимов в этом процессе [26].

Обнаруженная взаимосвязь совпадает и с тем, что было выявлено при СКВ, однако отношения здесь были более сложными: БАПНА-амидазная и гиалуронидазная активность IgG отрицательно коррелировала с симптомами почечной дисфункции, тогда как ДНКазная – положительно, что указывает на ее возможное участие в поражении почек при СКВ. Подтверждает это и ее положительная взаимосвязь с длительностью процесса.

Сходным образом абзимная активность была связана с признаками поражения печени при СКВ – при увеличении уровня билирубина и трансаминазы активность снижалась.

При вирусных гепатитах выявленные тенденции также сохранились.

Предварительный анализ матрицы признаков, проведенный по всей группе больных вирусными гепатитами, обнаружил определенные значимые связи между уровнями абзимной активности и проявлениями вирусных гепатитов.

Активность менялась противоположно признакам, характеризующим поражение печени при ВГ. Особенно это было характерно для острого гепатита В – найдена положительная корреляция с уровнем протромбинового индекса, сильная положительная корреляция с уровнем альбумина, такая же, но обратная, с уровнем глобулинов.

В свою очередь, при хроническом гепатите С БАПНА-амидазная активность IgG (в пересчете на сывороточную концентрацию ИГ) обнаружила средней силы отрицательную корреляцию с уровнем АТ к вирусу гепатита С ($r=0,49$; $p=0,07$).

Также при данной патологии повышенный уровень абзимной активности был характерен для более молодых больных (выявлена сильная отрицательная корреляция между БАПНА-амидазной активностью препаратов IgG и возрастом больных ($r=-0,71$; $p<0,05$). Другие же взаимосвязи здесь были недостоверными.

Многообразные связи были обнаружены между абзимной активностью и проявлениями аутоиммунных заболеваний щитовидной железы [89].

Анализ взаимоотношений между активностью иммуноглобулинов, и клинико-лабораторными проявлениями заболеваний обнаружил ряд достоверных взаимосвязей изучаемых признаков.

При диффузном токсическом зобе обращает на себя внимание наличие обратной зависимости между уровнями абзимной активности ИГ и содержанием тиреоидных гормонов (БАПНА-амидазной активности и Т4 ($r=-0,54$; $p=0,0029$; $n=30$), пероксидазной активности и Т3 ($r=-0,6$; $p=0,0006$; $n=30$), ДНКазной активности и Т3 ($r=-0,62$; $p=0,0003$; $n=30$). Имеется связь между ДНКазной активностью и уровнем антител к тиреоглобулину ($r=-0,65$; $p=0,0002$; $n=28$). Также выявлена корреляция пероксидазной активности ИГ и продолжительностью заболевания ($r=0,46$; $p=0,012$; $n=29$).

При аутоиммунном тиреоидите была выявлена связь ДНКазной активности ИГ с продолжительностью заболевания ($r=0,36$; $p=0,06$; $n=27$). Определялась взаимосвязь ДНКазной активности с

объемом щитовидной железы, определенного с помощью УЗИ ($r=0,44$; $p=0,048$; $n=21$).

При сочетании аутоиммунного тиреоидита с диффузным токсическим зобом ДНКазная активность коррелировала с Т4 ($r=0,52$; $p=0,03$; $n=17$) и содержанием антител к тиреоглобулину ($r=0,57$; $p=0,017$; $n=17$). Также с уровнем антител к тиреоглобулину коррелировала БАПНА-амидазная ($r=0,614$; $p=0,008$; $n=17$) и пероксидазная активность ($r=0,5$; $p=0,03$; $n=17$). Со степенью тяжести тиреотоксикоза при данном заболевании была связана ДНКазная ($r=0,47$; $p=0,037$; $n=20$) и БАПНА-амидазная активность ($r=-0,48$; $p=0,03$; $n=20$). Выявлена обратная связь между пероксидазной активностью и уровнем гемоглобина ($r=-0,61$; $p=0,0043$; $n=20$), а также содержанием общего белка в сыворотке крови ($r=-0,65$; $p=0,02$; $n=12$); между ДНКажной активностью ИГ и СОЭ ($r=-0,47$; $p=0,034$; $n=20$), содержанием лимфоцитов в крови ($r=-0,5$; $p=0,037$; $n=17$).

При подостром тиреоидите определялась обратная зависимость между пероксидазной активностью и числом эритроцитов крови ($r=-0,57$; $p=0,02$; $n=16$), а также прямая связь БАПНА-амидазной активности и Т3 ($r=0,64$; $p=0,0019$; $n=13$).

При узловом токсическом зобе пероксидазная активность была связана с уровнем Т3 ($r=0,6$; $p=0,047$; $n=11$) и Т4 ($r=0,83$; $p=0,0017$; $n=11$). ДНКазная активность коррелировала со степенью тяжести тиреотоксикоза ($r=0,63$; $p=0,02$; $n=13$) и возрастом пациентов ($r=0,77$; $p=0,021$; $n=13$).

При проведении корреляционного анализа уровней каталитической активности и проявлений рака щитовидной железы БАПНА-амидазная активность была связана с Т3 ($r=0,86$; $p=0,01$; $n=7$).

Полученные данные подтверждают возможность участия абзимов в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.

В частности, при аутоиммунном тиреоидите прежде всего обращает на себя внимание связь ДНКажной активности ИГ с продолжительностью заболевания и объемом щитовидной железы (по данным УЗИ). Это объясняется зависимостью ДНКажной активности от степени выраженности аутоиммунного патологического процесса, прогрессирующего со временем и приводящего к тяжелому нарушению функции органа [136]. Исходя из результатов корреляционного анализа можно заключить, что гипертрофическая форма аутоиммунного тиреоидита сопровождается большей ДНКажной активностью ИГ.

При сочетании аутоиммунного тиреоидита с ДТЗ наиболее показательны корреляционные взаимоотношения между ДНКазной, БАПНА-амидазной и пероксидазной активностью и содержанием антител к тиреоглобулину, что можно объяснить соответствием повышенной абзимной активности и тяжести аутоиммунных реакций, в данном случае характеризующихся патологическим содержанием антител к тиреоглобулину [10, 183]. При данном заболевании имеется обратная связь ДНКазной активности и числа циркулирующих лимфоцитов крови. С учетом новых данных об абзимной функции [73] нельзя исключить, что количественные изменения со стороны лимфоцитов происходят как вследствие аутоиммунного процесса, так и вследствие элиминации аутоагрессивных Т-клеточных клонов путем апоптоза, в том числе под действием IgG, гидролизующих нуклеиновые кислоты [73].

При ДТЗ самостоятельное значение может иметь связь пероксидазной активности ИГ и продолжительности заболевания, а также БАПНА-амидазной активности и изменения структуры щитовидной железы, проявляющееся при УЗИ неоднородностью ткани данного органа. Это может свидетельствовать о связи степени поражения щитовидной железы, продолжительности патологического процесса и абзимной активности при данной болезни.

При узловом токсическом зобе ДНКазная активность IgG высоко коррелировала со степенью тяжести тиреотоксикоза. Пероксидазная активность при данной патологии прямо коррелировала с уровнем тиреоидных гормонов. Не исключено, что такие абзимы реагируют на увеличение содержания в крови йодированного тиреоглобулина, участвуя в процессе его гидролиза.

При раке щитовидной железы прямо коррелировала ДНКазная активность антител и возраст пациентов. Известно, что признаки аутоиммунного процесса при карциноме щитовидной железы являются благоприятным прогностическим фактором [104, 115]. По полученным нами данным, ДНКазная активность при тиреоидной патологии отражает степень выраженности аутоиммунных реакций. Это соответствует тому, что у пожилых людей прогноз заболевания более благоприятный.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что антитела, обладающие абзимной активностью, вносят разнообразный вклад в патогенез тиреопатий. Вероятно, они могут обеспечивать

поддержание гипотиреоидного состояния, расщепляя ДНК в процессе цитотоксического воздействия на тиреоциты. Кроме того, они могут снижать возможности клеток синтезировать тиреоидные гормоны за счет повреждения тиреотропиновых рецепторов.

Наименьшие уровни абзимной активности при раке ЩЖ соответствуют минимальному вкладу аутоиммунных механизмов в патогенез данного заболевания.

РОЛЬ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

При изучении многообразных связей абзимов с проявлениями заболеваний закономерно возникает вопрос: является ли абзимная активность лишь иллюстрацией, своеобразным отражением, признаком протекающих в организме процессов, или она имеет самостоятельное патогенетическое или саногенетическое значение.

Безусловно, что оба варианта сосуществуют и не являются альтернативными, однако первый представляется максимально вероятным. Доказать же второй значительно труднее. В настоящее время даже не существует способа прямого определения абзимной активности непосредственно в сыворотке без выделения ИГ. Проследить же взаимодействие абзимов с природными субстратами *in vivo* на тканевом и клеточном уровне – еще более сложная задача.

Однако существует ряд указаний на то, что при определенных условиях абзимная активность может иметь самостоятельное патогенетическое значение.

Нашими и другими исследованиями [43, 73, 159] показано, что весьма часто абзимная активность полностью отличается от соответствующего действия природного фермента, и она на порядки увеличивается после стимуляции индукторами. Это может приводить к запуску патологического процесса.

Например, при бронхолегочном аспергиллезе, вызванном *Aspergillus fumigatus* – основным возбудителем аспергиллезов у человека – в организме в течение длительного периода персистируют грибковые антигены, проявляющие многообразную биологическую активность. В свою очередь, к ним возникают специфические ан-

титела в высоких титрах, не обладающие, однако протективным эффектом. При дальнейшем изучении были обнаружены аутореактивные АТ к белковым структурам (фибронектину и коллагену), а также АТ с ДНКазной активностью. По мнению авторов, обнаружение каталитических АТ при грибковых заболеваниях открывает новую страницу в их патогенезе [244].

Кроме того, хотя суммарная поликлональная абзимная активность в целом невелика, при определенных условиях она может быть достаточно существенной. Наши данные по сопоставлению БАП-НА-амидазной (протеолитической) активности ИГ (на 1 мл сыворотки) с суммарной сывороточной протеолитической активностью в целом схожи с полученными R.Kalaga с соавт. [312]. По нашим данным, в некоторых случаях абзимная активность препарата IgG может составлять до 5% от суммарной активности сыворотки, по данным работы [312] – даже свыше 30% по отношению к конкретному белковому субстрату. Это весьма существенная величина, она может быть патогенетически значимой, учитывая индуцибельность появления, длительный период полураспада [50] и возможность направленного транспорта (“таргетирования”) молекул IgG; реакции же протеолиза задействованы в развитии большинства патологических процессов.

В частности при ревматоидном артрите доказано появление АТ с протеолитической активностью к пентапептиду Gln-Arg-Arg-Ala-Ala – белковому компоненту, ассоциированному с риском развития РА. Кроме того, при РА происходит изменение субстратной специфичности абзимов-протеаз в сравнении с здоровыми донорами – IgG больных с большей эффективностью гидролизуют карбобензоксид-Val-Gly-Arg-p-нитроанилид в сравнении с другим пептидом, D-Pro-Phe-Arg-p-нитроанилидом, что отличало IgG больных от ИГ доноров [236].

Эксперименты по введению лабораторным животным моноклональных АТ-ВИПаз (абзимов, гидролизующих вазоактивный интестинальный полипептид), приводили к развитию выраженного воспалительного процесса в дыхательных путях, что указывает на их самостоятельное патогенетическое значение [256].

У больных с приобретенной формой ангионевротического отека обнаруживаются аутоантитела, являющиеся причиной дефицита ингибитора С1-компонента комплемента при данном варианте за-

болевания. Предполагается, что такая инактивация может происходить вследствие абзимного действия АТ [165].

Lacroix-Desmazes S. с соавт. показали, что у больных гемофилией А, получавших для лечения инфузии донорского фактора свертывания VIII (F_{VIII}), возникают АТ, не только блокирующие аллогенный фактор VIII, но и вызывающие его сайт-специфический протеолиз [227]. Кинетические параметры абзимной активности продемонстрировали функциональную значимость таких АТ для инактивации F_{VIII} , что требует коррекции при лечении данного заболевания коагулянтами.

Что касается ДНКазной активности, то нуклеазная абзимная активность не превышала по нашим данным 1% от сывороточной ДНКазной активности. Тем не менее, в исследованиях [44] было продемонстрировано, что АТ и их фрагменты могут достигать ядра клетки. Связываясь с нуклеопротеинами, они существенно влияют на внутриклеточный метаболизм [101]. В свою очередь, в работе [73] было указано, что нуклеазные абзимы могут прямо регулировать клеточное развитие, участвуя в процессах апоптоза.

Недавно это положение получило прямые экспериментальные доказательства.

Показано, в частности, что некоторые из белков Бенс-Джонса (легкие цепи ИГ, образующиеся при миеломной болезни) оказались способными проникать в ядро клеток и вызывать апоптоз (исследование Matsuura K. с соавт., 1999 г. и Sinohara H. с соавт, 2000 г. [294, 289]). На модели LLC-PK1 клеточной линии (клеток проксимальных канальцев почек свиньи) показано поступление абзимных L-цепей через мембрану клетки в цитоплазму и далее в ядро. Внутриядерно локализованные L-цепи приводили к фрагментации ДНК *in situ* и клеточной гибели. Цитотоксическая активность не была связана единственно с нуклеазной активностью АТ, так белки Бенс-Джонса без нуклеазной активности также вызывали гибель клеток.

Аналогично, в исследованиях Kozuyg A.V. с соавт. [225] было обнаружено, что абзимы с ДНКазной активностью, выделенные из сывороток больных СКВ и хроническим лимфолейкозом оказывают выраженный цитотоксический эффект на опухолевые клеточные линии L929 и HL-60 в концентрации до 10^{-10} М. В свою очередь, АТ от здоровых доноров, больных Т-клеточными лимфомами, В-кле-

точной лимфосаркомой и острым В-лимфолейкозом не проявляли подобной активности [225].

Цитотоксическое действие ИГ хорошо коррелировало с ДНКазной активностью АТ. Оба этих эффекта усиливались при адсорбции АТ на нуклеопротеидном матриксе. Активность блокировалась инкубацией IgG с двуспиральной ДНК.

Все это значительно расширяет патогенетический потенциал нуклеазных абзимов.

Однако не менее важным представляется возможное участие абзимов и в защитных (компенсаторных, саногенетических) процессах. Такие предположения выдвигались уже неоднократно [48, 73, 235]. Постепенно они стали находить экспериментальное и клиническое подтверждение.

Повышенный уровень нуклеазной абзимной активности в молоке родильниц может играть решающую роль в защите новорожденного с его несовершенной иммунной системой от инфекционных патогенов, в первую очередь – от РНК- и ДНК-содержащих вирусов [67].

Предполагается также, что нуклеазная абзимная активность молока может иметь протективное значение при развитии рака молочной железы [67].

Li L. с соавт. считают, что абзимный гидролиз тиреоглобулина может снижать выраженность аутоиммунного процесса при тиреоидите, замедляя отложение иммунных комплексов в ткани железы [156].

Наконец, Paul S. с соавт. продемонстрировали способность легких цепей ИГ больных миеломой вызывать гидролиз антигенов вируса иммунодефицита человека, в частности – гликопротеина gp120. Эти участки иммуноглобулиновой молекулы более чем в 100 раз снижали токсическое действие gp120 на культуру нейроцитов [259].

Мы получили данные о наличии обратных взаимосвязей между абзимной активностью и симптомами поражения внутренних органов (в первую очередь почек и печени) при ревматических болезнях и вирусных гепатитах. Эти результаты делают возможным предположение, что после начала патологического процесса происходит компенсаторное увеличение абзимной активности. Прямой защитный механизм абзимного действия прослеживается при СКВ

(разрушение избытка эндогенной ДНК) или при вирусных гепатитах (гидролиз вирусной нуклеиновой кислоты).

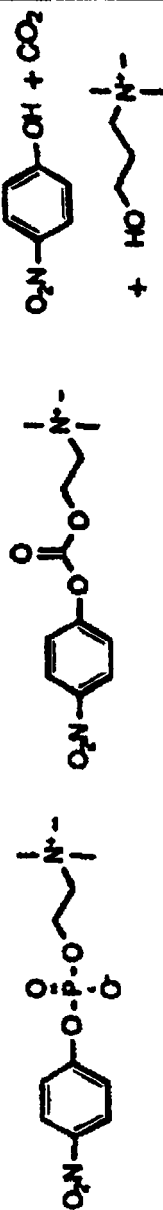
Прогрессирование же патологического процесса приводит к поражению большинства внутренних органов с одновременным снижением абзимной активности. Почему оно происходит – вследствие ли развивающегося в ходе болезни вторичного иммунодефицита, или обусловлено проводимым лечением, или определяется образованием высокоаффинных, но некаталитических АТ [187, 188] – все это, несомненно, может послужить предметом для проведения дальнейших исследований.

Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными абзимами
 ... (по R.A.Lerner, S.J.Benkovic, P.G.Schultz [233], с дополнениями)

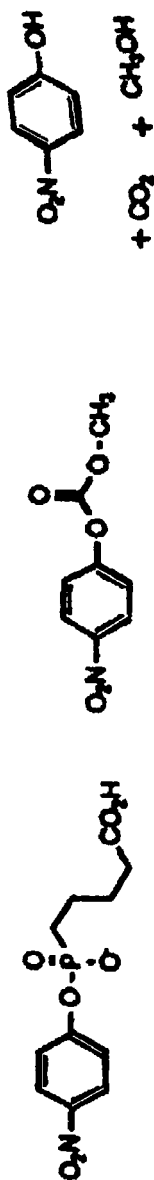
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

ГИДРОЛИЗ КАРБОНАТОВ (РЕАКЦИИ 1-2)

1



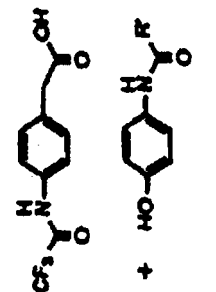
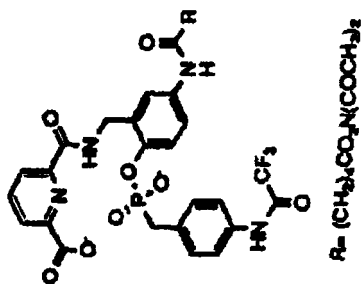
2



Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными абзимами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

ГИДРОЛИЗ ЭФИРОВ (РЕАКЦИИ 3-15)

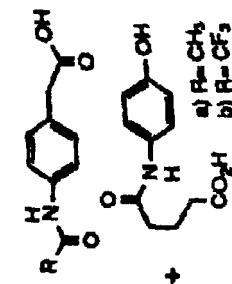
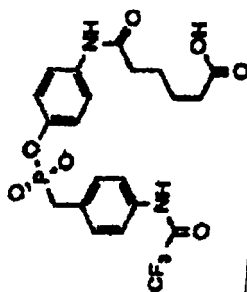
3



a) $R = CH_3$
b) $R = (CH_2)_6CO_2H$

a) $R = CH_3$
b) $R = (CH_2)_6CO_2H$

4

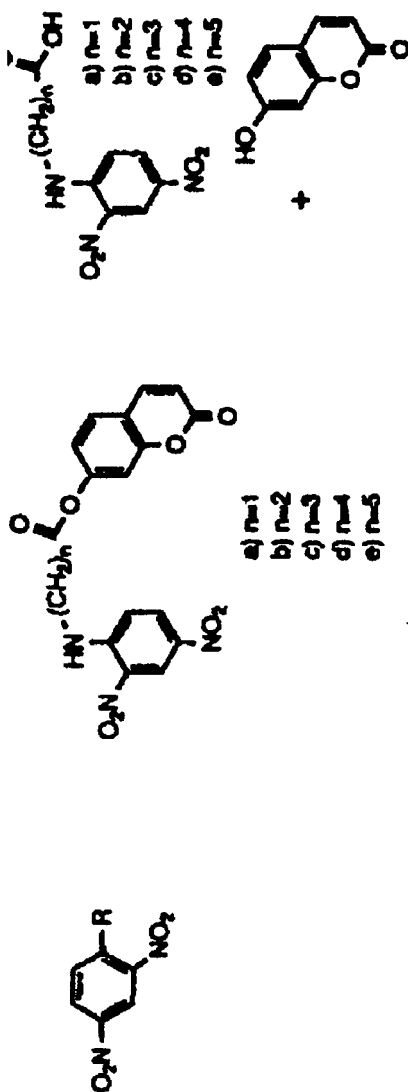


a) $R = CH_3$
b) $R = CF_3$

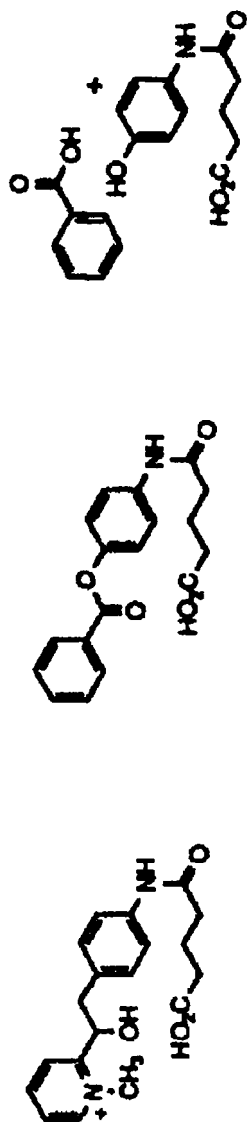
a) $R = CH_3$
b) $R = CF_3$

Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

5

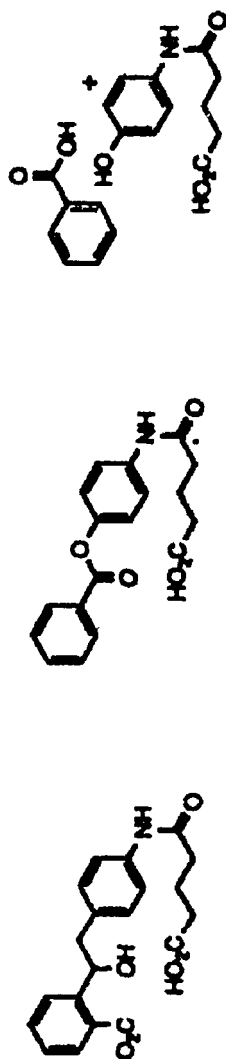


6

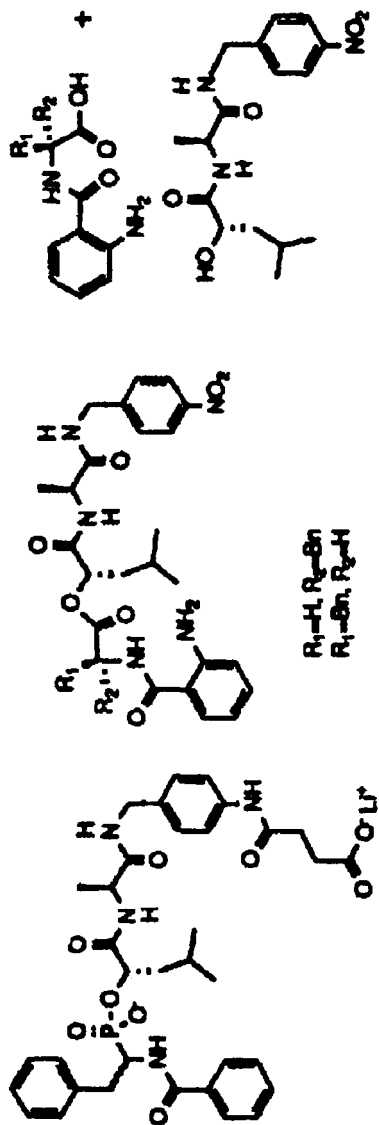


Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

7

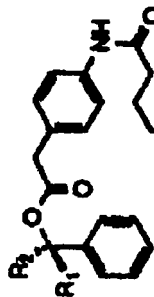
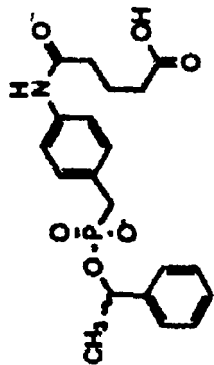


8

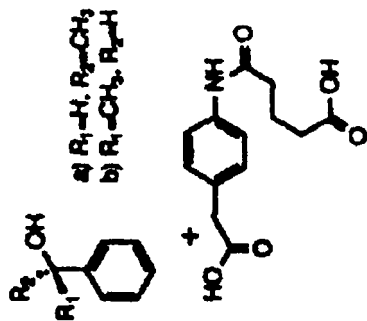


Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых монохлоральными абзирами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

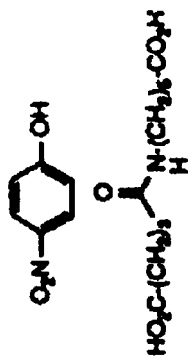
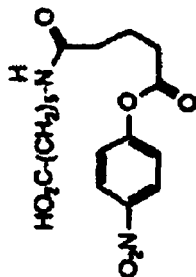
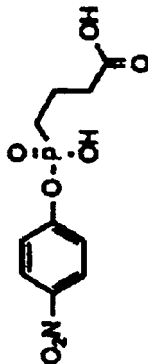
9



a) $R_1=H, R_2=CH_3$
b) $R_1=CH_3, R_2=H$

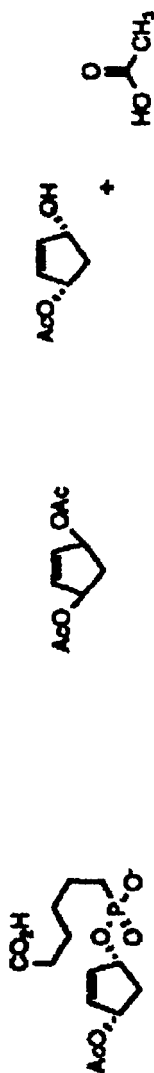


10

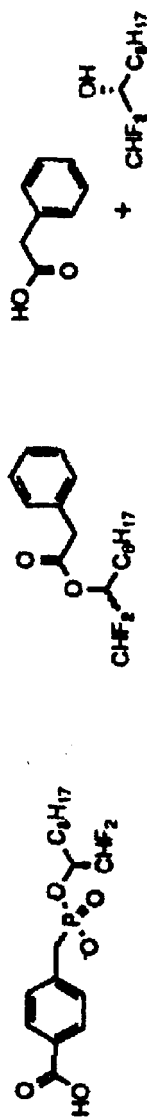


Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке — иммуноген, во второй — субстрат реакции, в третьей — ее продукты)

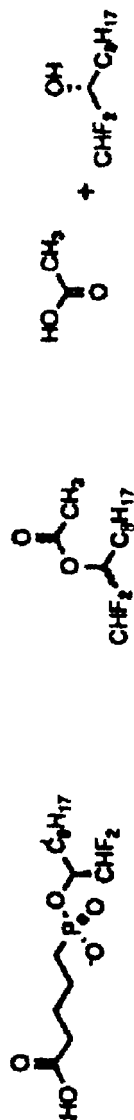
11



12

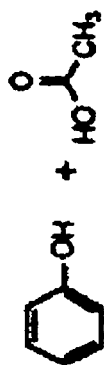
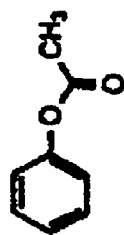


13

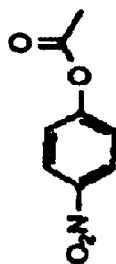


Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке — иммуноген, во второй — субстрат реакции, в третьей — ее продукты)

14



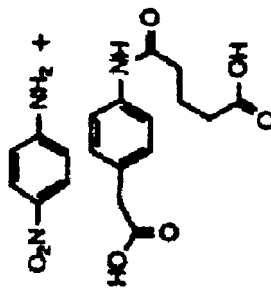
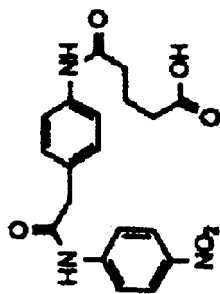
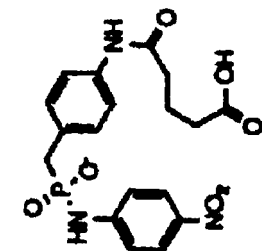
15



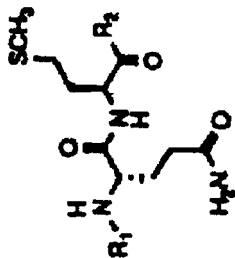
Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

ГИДРОЛИЗ АМИДОВ (16-18)

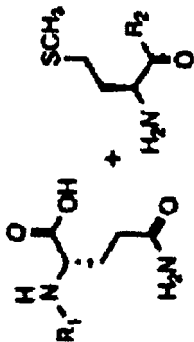
16

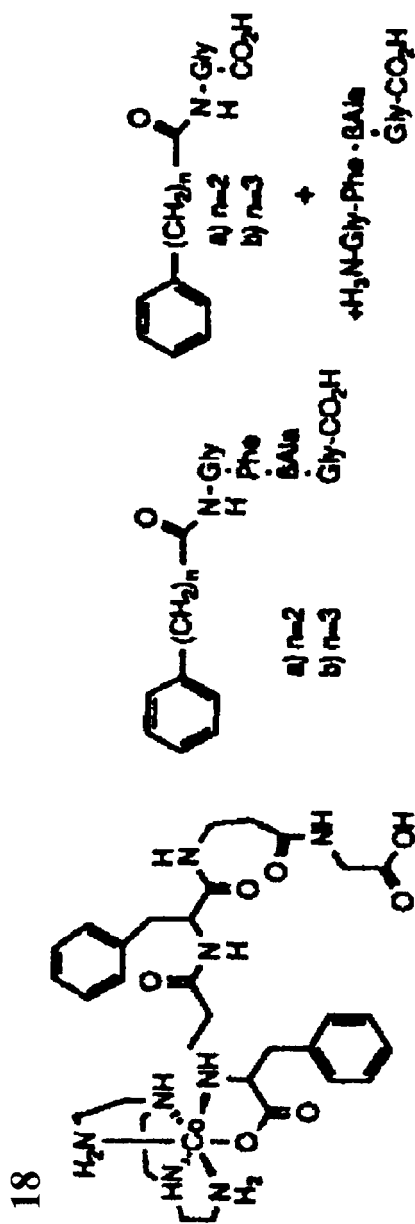


17



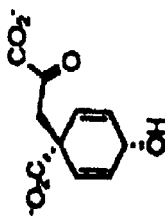
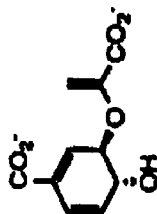
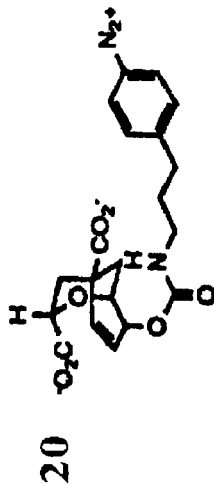
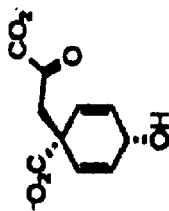
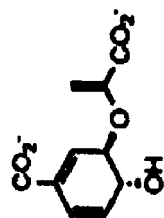
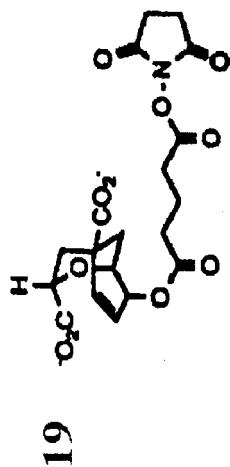
Не приведен





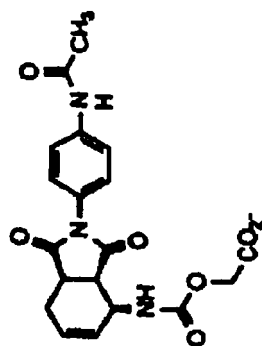
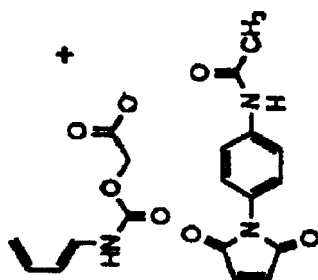
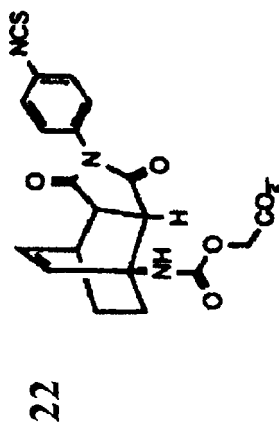
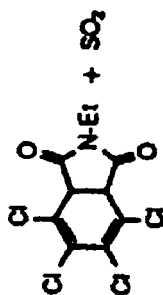
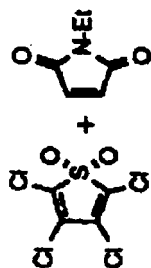
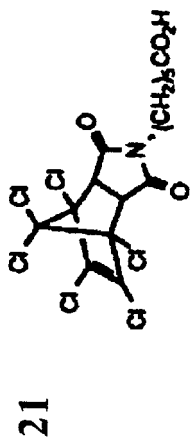
Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными абзимами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

ПЕРЕГРУППИРОВКА КЛЯЙЗЕНА



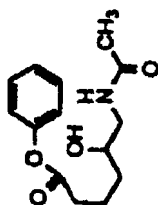
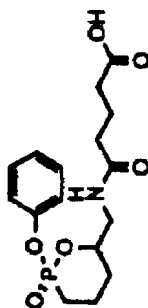
Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными абзимами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

РЕАКЦИЯ ДИЛЬСА-АЛЬДЕРА

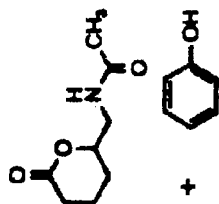


Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых монофункциональными абзимами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

23

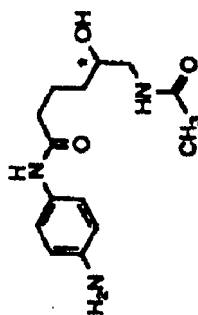
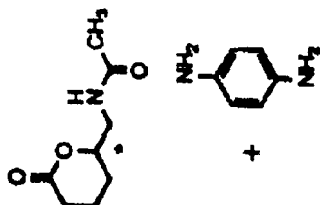
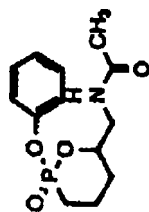


ОБРАЗОВАНИЕ ЛАКТОНА



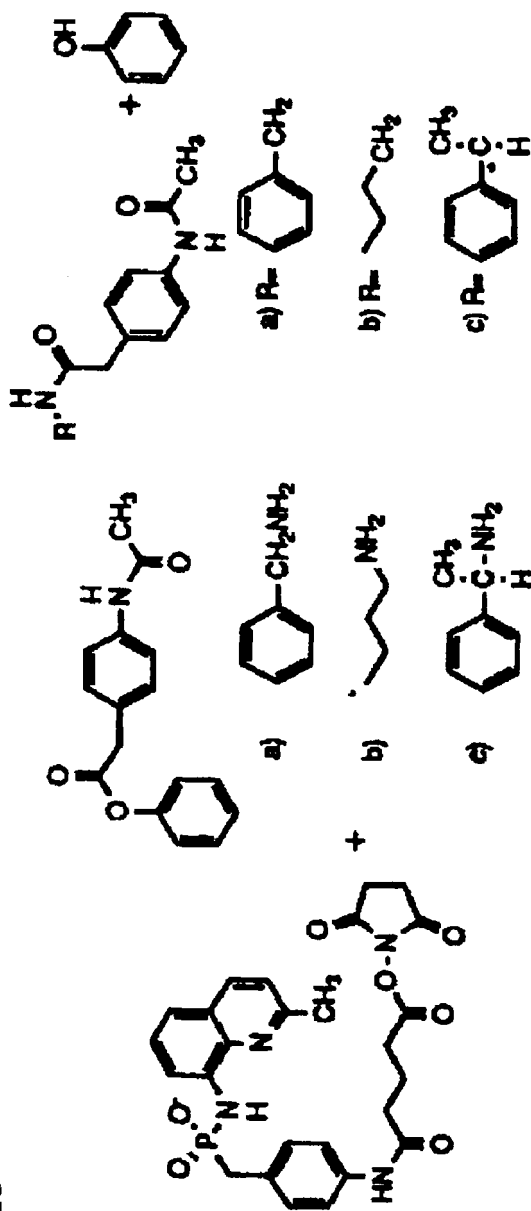
ОБРАЗОВАНИЕ АМИДНОЙ СВЯЗИ

24



Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

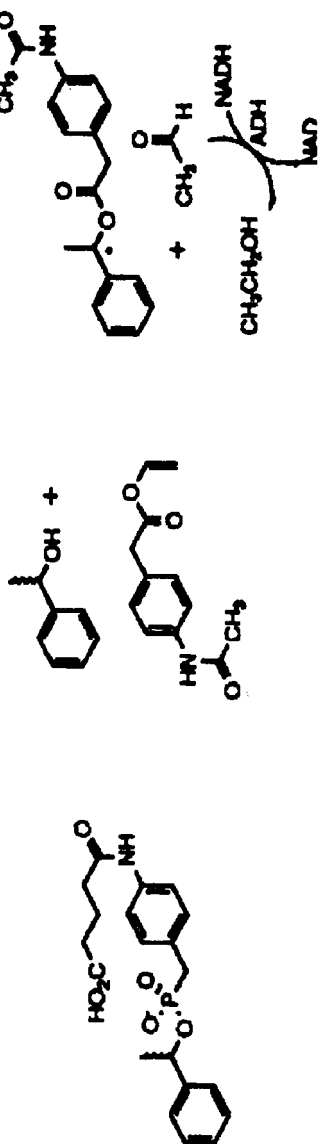
25



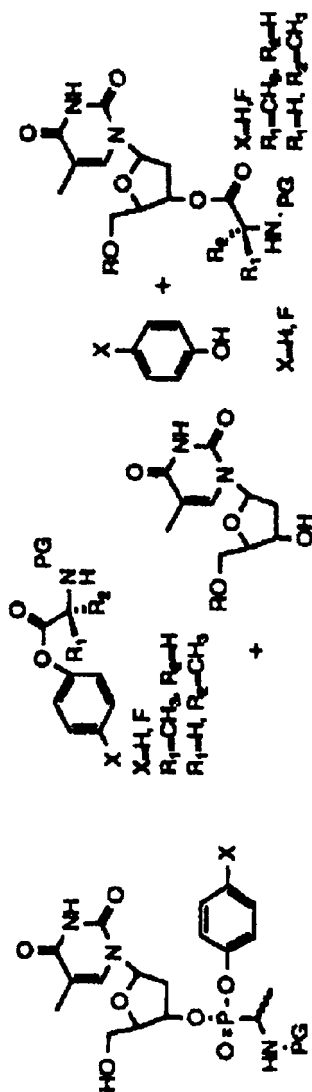
Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

26

ТРАНСЭТЕРИФИКАЦИЯ



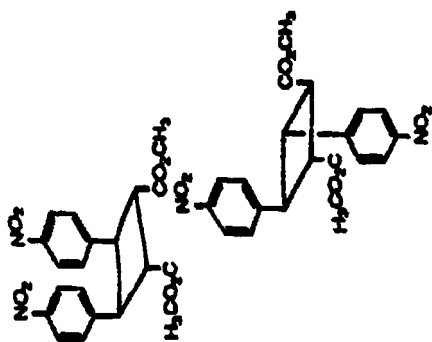
27



Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

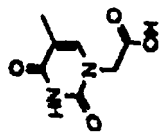
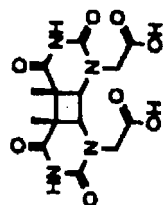
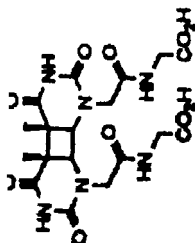
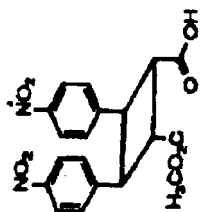
28

ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ ДИМЕРИЗАЦИЯ



29

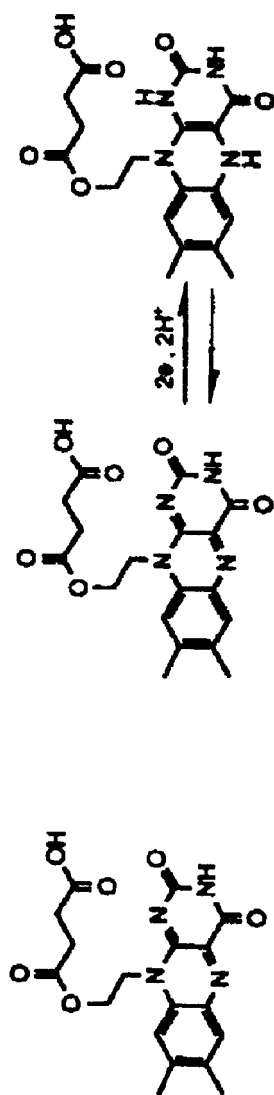
ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ РАСПАД



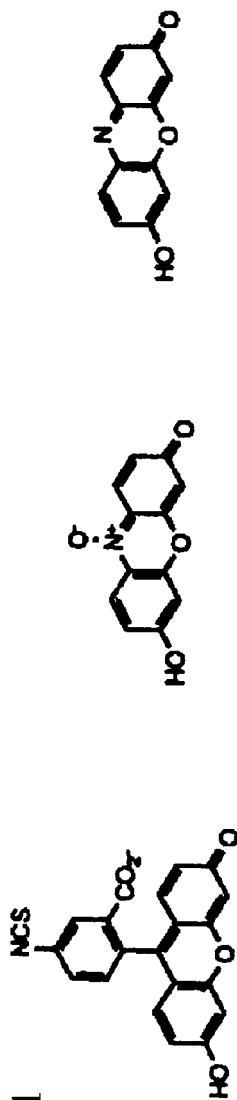
Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

30



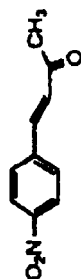
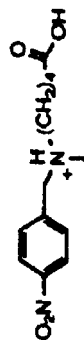
31



Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

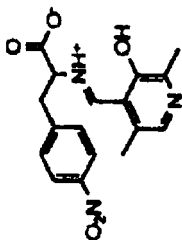
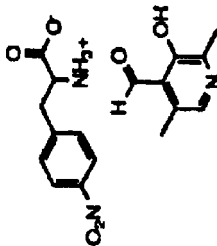
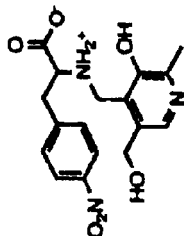
32

β-ЭЛИМИНАЦИЯ



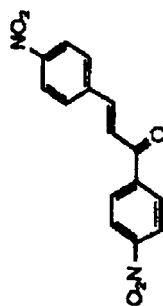
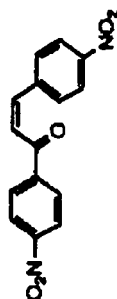
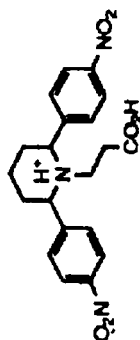
33

ОБРАЗОВАНИЕ ИМИНОВ



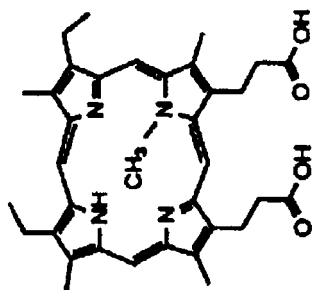
34

ЦИС-ТРАНС-ИЗОМЕРИЗАЦИЯ

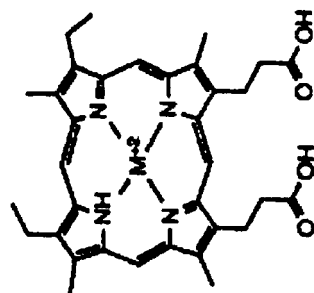
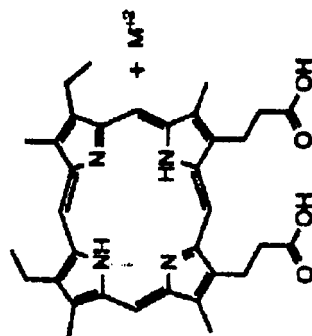


Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными абзимами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

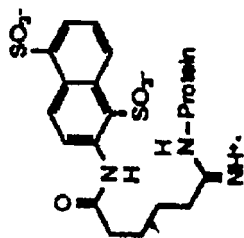
35



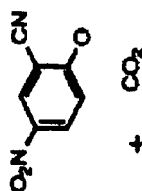
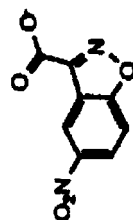
ХЕЛАТИРОВАНИЕ



36



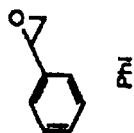
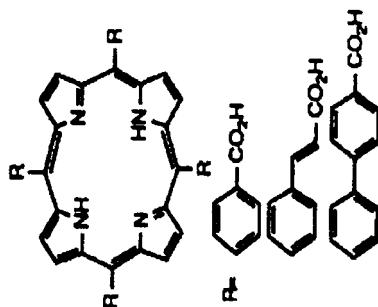
ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ



Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными абзимами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

37

ОБРАЗОВАНИЕ ЭПОКСИДОВ



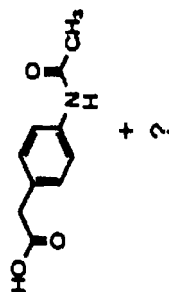
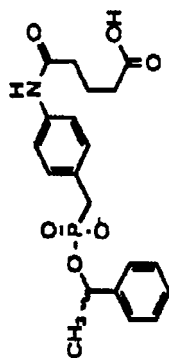
PhI



PhIO

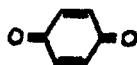
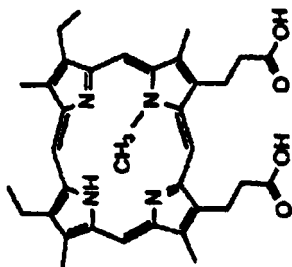
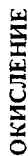
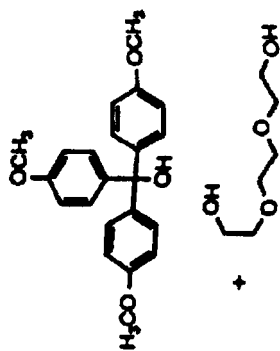
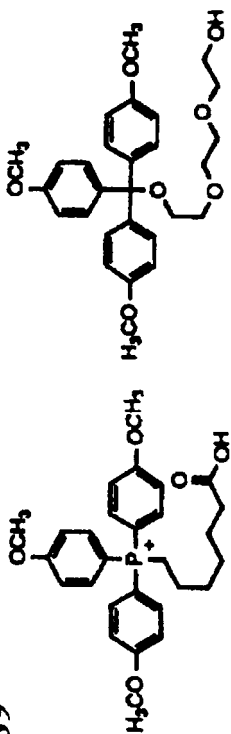
38

ЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ



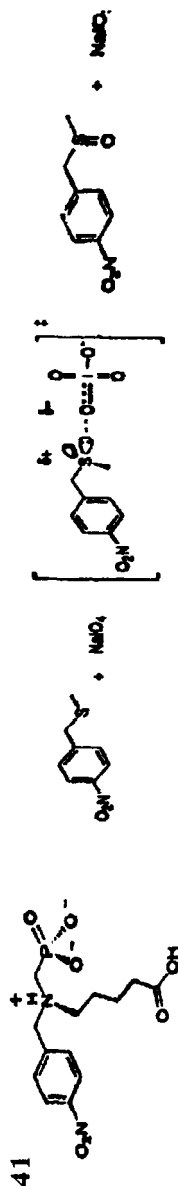
Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными абзимами (в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

ТРИТИЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ

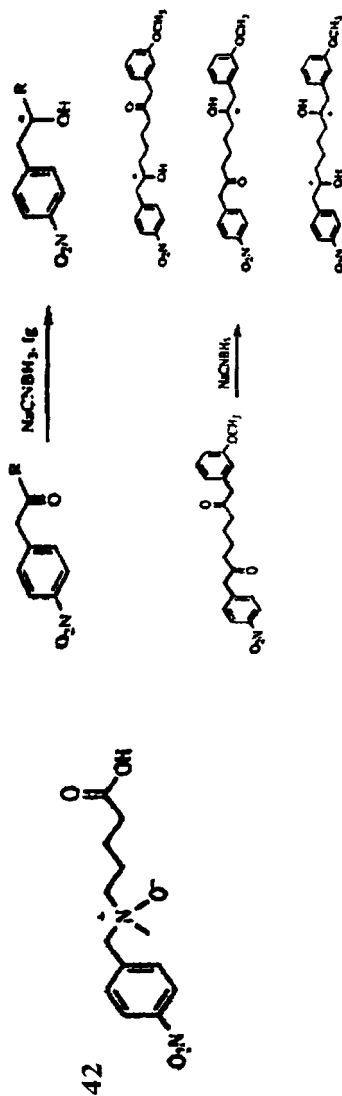


Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными антителами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

ПЕРИОДАТ-ЗАВИСИМОЕ ОКИСЛЕНИЕ

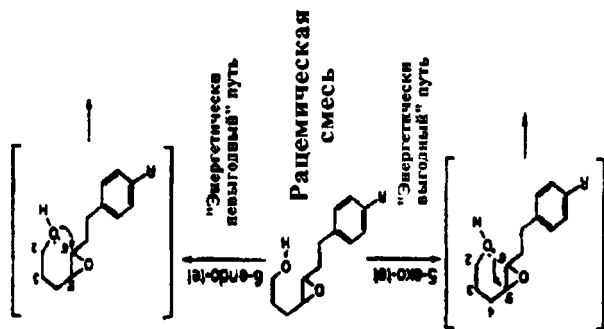


БОРГИДРИД-ЗАВИСИМОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЕТОНОВ



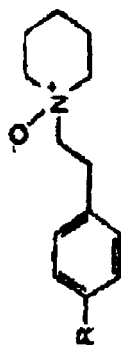
Приложение. Примеры некоторых химических реакций, катализируемых моноклональными абзимами
(в первой колонке – иммуноген, во второй – субстрат реакции, в третьей – ее продукты)

РЕАКЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ЦИКЛОВ НЕ ПО «ПРАВИЛАМ БАЛДВИНА»



Стереоспецифический продукт

Рацемическая смесь



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Адамов А.К., Павлова Ю.П. Активирование иммунными сыворотками бактериостатического и бактерицидного действия лизоцима, фосфоглюкомутазы и ксантиноксидазы/ Всес. н.-и. противочум. ин-т Микроб.-Саратов, 1989.-Деп. в ВИНТИ 30.08.89.-N 5626-B89.
2. Азаренок К.С., Генералов И.И. Новые функции антител //Тер. арх.-1990.-Т.62, N 5.-С. 149-153.
3. Азаренок К.С., Генералов И.И. Определение гиалуронидазной активности методом риванолового сгустка// Клин.лаб.диагн.-1994, N5.-С.40-42.
4. Азаренок К.С., Генералов И.И. Способность к катализу как новая регуляторная функция антител// Физиологические и биохимические аспекты патологических процессов.-Смоленск, 1990.-С.94-97.
5. Александрова Е.С. Исследование взаимодействия ДНК-гидролизующих аутоантител из сывороток крови больных лимфопролиферативными заболеваниями с олигодезоксирибонуклеотидами методом аффинной сорбции// Мол.биол.-1996.-Т.30, вып.4.-С.921-927.
6. Алексеева И.Н., Назаренко А.И., Павлович С.И. Влияние антител к цитохрому с на восстановительные процессы в печени и возможное участие в реализации их действия антиидиотипических антител// Физиол. журн.-1987.-Т.33, N4.-С. 79-84.
7. Антиидиотипические и природные каталитически активные антитела/ А.М. Шустер, Г.В. Гололобов, О.А. Квашук и др.// Молекулярная биология.-1991.-Т.25.-№3.-С.17.
8. Антитиреоидные антитела и аутоиммунные заболевания щитовидной железы/ В.И. Кандрор, И.В. Крюкова, С.И. Крайнова и др.-Проблемы эндокринологии.-1997.-Т.43.-№3.-С.25-30.
9. Ашмарин И.П., Фрейдлин И.С. Гипотеза об антителах как новейших регуляторах физиологических функций, созданных эволюцией // Журнал эволюционной биохимии и физиологии.-1989.-Т. 25, N2.-С. 176-181.
10. Березин В.А., Гербильный Л.В., Корниловская И.Н. Тиреоглобулин //Проблемы эндокринологии.-1993.-Т.39.-№4.-С.54-59.
11. Берзофски Д.А., Берковер А.Д. Взаимодействие антиген-антитело// Иммунология: Пер с англ./Под ред. У.Пола.-М.: Мир, 1989.-Т.3.-С.5-88.
12. Бернхард С. Структура и функция ферментов: пер. с англ.-М.: Мир, 1971.-336 с.
13. Биохимические подходы к стандартизации сывороточных препаратов/ Петяев И.М., Скачек А.В, Белоусова С.С., Маторина Н.А.//

- Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов.–1984.–С.107–109.
14. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика–практический курс.– М.: Фаир–Пресс, 1998.–720 с.
 15. Взаимодействие каталитически активных антител с ДНК/ А.М. Шустер, Г.В. Гололобов, О.А. Квашук и др. /Доклады АН СССР.–1991.–Т.319.–№6.–С.1504–1507.
 16. Взаимодействие каталитически активных антител с олигорибонуклеотидами /Бунева В.Н., Андриевская О.А., Романникова И.В. и др.// Мол.биол.–1994.–Т.28, вып.4.–С.739–743.
 17. Волькенштейн М.В. Молекулярные основы эволюции// Мол.биол.–1989.–Т.23, вып.1. –С.33–51.
 18. Генералов И.И. Взаимодействие поликлональных IgG человека с катионами металлов// Теоретические и практические вопросы медицины и фармации.–Витебск, 2000.–С.105–108.
 19. Генералов И.И. Комплексная оценка абзимной активности поликлональных IgG при аутоиммунных, вирусных и онкологических заболеваниях// Иммунопатология, аллергология, инфектология.–2000.–№3.–С.19–24.
 20. Генералов И.И., Азаренок К.С. Изучение реакции расщепления гиалуроновой кислоты под действием антител методом риванолового сгустка// Эндокринные и иммунные механизмы регуляции гомеостаза: Сб.ст.–Смоленск, 1991.–С.80–83.
 21. Генералов И.И., Жильцов И.В. Каталитическая активность комплексов иммуноглобулинов с металлами// Актуальные проблемы экологической и клинической иммунологии: материалы II Пленума Белорусского научного общества иммунологов и аллергологов, 20–21 октября 1993 г., Могилев, 2 часть.–Минск, 1995.–С.3–6.
 22. Генералов И.И., Кардович Г.А. Абзимы (обзор). Сообщение 1. Получение, свойства и применение антител, обладающих ферментативной активностью/ Витебский медицинский институт Минздрава Республики Беларусь.–Витебск, 1993.–19 с.–Деп. в ВИНТИ 31.08.93., N 2367–В93.
 23. Генералов И.И., Кардович Г.А. Абзимы (обзор). Сообщение 2. Роль каталитических антител в возникновении и развитии патологических процессов/ Витебский медицинский институт Минздрава Республики Беларусь.–Витебск, 1993.–14 с.–Деп. в ВИНТИ 31.08.93., N 2368–В93.
 24. Генералов И.И., Новиков Д.К. Поликлональные каталитические антитела и их возможное биологическое значение. Усп. совр. биол. –1998.–Т.118, вып.2.–С.178–193.
 25. Генералов И.И., Новиков Д.К., Жильцов И.В. Взаимодействие поли-

- клональных IgG человека с катионами металлов// Весці НАН РБ (серыя біялагічных навук).–1999.–№1.–С.95–101.
26. Генералов И.И., Сидорская Е.В. Абзимная активность препаратов IgG у больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой// Иммунология.–1998.–№3.–С.54–56
 27. Генералова А.Г., Генералов И.И. Оценка ДНКазной активности методом риванолового сгустка// Клин.лаб.диагн.–1997.–№11.–С.24, 33–34.
 28. Главинская Т.А., Комарова В.Д., Добротина Н.А. Использование электрофореза в геле для фракционирования риванолрастворимых сывороточных белков// Лаб.дело.–1976.–№10.–С.586–602.
 29. Грунина Е.А., Виноградова Н.А. Кортикостероиды при ревматоидном артрите – базисные препараты?// Клин.фармакол. тер.–2000.–Т.9, №2.–С.51–57.
 30. Гуморальные и клеточные иммунные факторы при аутоиммунном тиреоидите/ Е.Е. Потемкина, Д.С. Рафибеков, Е.Е. Фомина и др.– Проблемы эндокринологии.–1995.–Т.41.–№1.–С.9–11.
 31. Джеске Д.Д., Кепра Д.Д. Иммуноглобулины: строение и функции// Иммунология: Пер с англ./Под ред. У.Пола.–М.: Мир, 1987.–Т.1.–С. 204–254.
 32. Диксон М., Узбб Э. Ферменты: Пер. с англ.–М.: Мир, 1982.–Т.1.
 33. ДНК и РНК–гидролизующие антитела из крови больных различными формами вирусного гепатита/ Барановский А.Г., Матюшин В.Г., Власов А.В. и др //Биохимия.–1997.–Т.62.–№12.–С.1590–1599.
 34. ДНК–и РНК–гидролизующие антитела из молока человека и их возможная биологическая роль/ Канышкова Т.Г., Семенов Д.В., Власов А.В. и др.// Мол. биол.–1997.–Т.31, №6.–С.1082–1091.
 35. ДНК–гидролизующие антитела при лимфопролиферативных заболеваниях/ А.В. Козырь, А.В. Колесников, Е.И. Яхнина и др.–Бюлл. эксп. биол. мед.–1996.–№2.–С.204–206.
 36. ДНК–специфические каталитические антитела в сыворотках крови человека /А.М. Шустер, Г.В. Гололобов, О.А. Квашук, А.Г.Габибов //ДАН СССР–1991.–Т.318.–№5.–С.1262–1264.
 37. Езепчук Е.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий.–М., 1977.
 38. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул.–М., 1985.–238 с.
 39. Зорин Н.А., Жабин С.Г. Высокочувствительный способ детекции иммунопреципитатов в агарозных гелях с помощью коллоидного серебра.–М., 1989.–10 с.–Деп. в ВИНТИ 12.09.89, N 5822–В89.
 40. Ибрагимов А.Р. Гены аутоантител// Мол.биол.–1989.–Т.23, вып.1.–С.5–32.

41. Иммуноанализ ферментов/ Жердев А.В., Резчиков А.А., Дзантиев Б.Б., Егоров А.М.// Ж.Всес.хим.о-ва им.Д.И.Менделеева.–Т.34, №1.–С.38–46.
42. Иммуноглобулины класса G с гиалуронидазной активностью и возможные механизмы их образования/ Азаренок К.С., Генералов И.И., Доценко Э.А., Окулич В.К.// Иммунология.–1989.–№ 2.–С.15–17.
43. Иммуноглобулины класса M из сыворотки крови больных системной красной волчанкой эффективно расщепляют РНК/ Андриевская О.А., Бунева В.Н., Забара В.Г. и др.// Мол. биол.–1998.–Т.32, №5.–С.908–915.
44. Иммунологическая регуляция клеточных функций: Сб. науч. тр./ Ленингр. педиатр. мед. ин-т.: Ред. Зайчик А.Ш.–Л., 1988.–134 с.
45. Инструкция по применению гиалуронидазы стрептококковой сухой от 11 августа 1986 г.: Утв. зам. начальника Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР Дрыновым И.Д. 11 августа 1986 г.–М.: НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи.–4 с.
46. Исследование кинетики эндонуклеазных реакций методом линейного дихроизма в потоке/ Якубовская Е.А., Гололобов Г.В., Куделина И.А. и др.// Мол.биол. –1996.–Т.30, вып.6.–С.1378–1384.
47. Кандрор В.И. Эутиреоидный зоб: аутоиммунный компонент патогенеза //Проблемы эндокринологии.–1988.–№1.–С.32–40.
48. Кит Ю.Я., Семенов Д.В., Невинский Г.А. Существуют ли каталитические антитела у здоровых людей? //Мол.биол.–Т.29, №4.–С.893–905.
49. Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ.–М.: Изд-во Московского ун-та, 1980.–264 с.
50. Клиническая иммунология и аллергология: в 3 т.; пер. с нем. /Под ред. Л. Йегера.–М.: Медицина, 1990. Т.1–3.
51. Клиническая ревматология: Пер.с англ./Под ред. Х.Л. Ф.Каррея. М.: Медицина, 1990.–448 с.
52. Кометиани З.П., Векуа М.Г. Кинетика мембранных транспортных ферментов.–М.: Высш. школа, 1988.–112 с.
53. Конформационное превращение антитела в его антиидиотипический эквивалент/ Кульберг А.Я., Тарханова И.А., Маргулис Г.У. и др.// Иммунология.–1990.–№1.–С.16–18.
54. Кульберг А.Я., Беркун Ю.Б. Сывороточный IgG как ингибитор лектинов: новый подход к изучению функционального взаимодействия факторов естественного и приобретенного иммунитета// Иммунология.–1998.–№1.–С.7–10.
55. Кульберг А.Я., Беркун Ю.Б., Чекнев С.Б. Влияние субфракций IgG с различным сродством к переходным металлам на спонтанную бластотрансформацию in vitro// Иммунология.–1997.–№6.–С.7–9.
56. Кульберг А.Я., Оганян Р.Р., Шибнев В.А. Утилизация радикалов кис-

- лорода синтетическими пролин-богатыми олигопептидами// Биохимия.-1992.-Т.57, вып.11.-С.1744-1749.
57. Кульберг А.Я., Петяев И.М. Каталитические свойства антиидиотипических антител и антирецепторов// Иммунология.-1988.-N 6.-С.10-13.
 58. Кульберг А.Я., Петяев И.М., Замотаева Н.Г. Каталитические свойства продуктов катаболического распада клеточных рецепторов (R-белков) //Иммунология.-1988.-№3.-С.37.
 59. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний/ Цончев В.Т., Попов Н., Коларов С., Каракашов А.-София: Медицина и физкультура, 1964.-292 с.
 60. Леках И.В., Поверенный А.М. Антитела к ДНК в препаратах иммуноглобулинов и сыворотках крови здоровых людей находятся в свободном и связанном состоянии// Мол. биол.-1996.-Т.30, вып.3.-С.707-713.
 61. Макс Э.Е. Иммуноглобулины: молекулярная генетика// Иммунология: Пер с англ./Под ред. У.Пола.-М.: Мир, 1987.-Т. 1.-С.255-312.
 62. Маргулис Г.У., Бабаева Е.Е., Неугодова Г.Л. и др. Сывороточный антииммуноглобулин человека - пепсиновый агглютинатор гомореактант как протеиназа//Иммунология.-1992.-N2.-С.55-57.
 63. Матулис А., Ульвидене И. Антитела к гиалуроновой кислоте при ревматических заболеваниях// Научные труды НИИ экспер. и клин. медицины МЗ ЛитССР. Ревматология (9). Клиника, диагностика и лечение ревматических заболеваний.-Вильнюс, 1971.- Вып.14.- С.85-88.
 64. Механизмы иммунопатологии: Пер. с англ./Под ред. Коена С., Уорда П.А., Мак-Класки Р.Т.-М.: Медицина, 1983.-400 с.
 65. Нарушение реакций образования тромбина/ под ред. Колмена Р.У.: пер. с англ.-М.: Медицина, 1988.-240 с.
 66. Насонова В.А., Астапенко М.Г.. Клиническая ревматология.-М.: Медицина, 1989.-592 с.
 67. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии// Биохимия.-2000.-Т.65, №11.-С.1245-1255.
 68. Некоторые аспекты иммунного ответа на гиалуронидазу как фактор агрессии микроорганизмов/ Генералов И.И., Азаренок К.С., Доценко Э.А., Окулич В.К.// Актуальные вопросы патогенеза и терапии инфекционных и паразитарных болезней: Сб. ст.-Л., 1987.-С.10-16.
 69. Нестеренко В.Г. Регуляторные клетки и сетевые взаимодействия в иммунной системе// Клеточные факторы регуляции иммуногенеза.-Новосибирск, 1985.-С.71-78.
 70. О катаболизме иммуноглобулина G/ Кульберг А.Я., Дочева Ю.В.,

- Свирижева М.Н., Тарханова И.А.// Вестник АМН СССР.–1970.–№7.–С.15–25.
71. О протеолитической активности в препаратах очищенного иммуноглобулина G и антител кролика/ Кульберг А.Я., Дочева Ю.В., Тарханова И.А., Спивак В.А.// Биохимия.–1969.–Т. 34, вып.6.–С.1178.–1183.
 72. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии.–М., 1964.–Т.1.–С.271–281.
 73. Особенности гидролиза тРНК аутоантителами из сыворотки крови больных некоторыми аутоиммунными и вирусными заболеваниями/ А.В.Власов, М.Хельм, В.А.Наумов и др.–Мол. биол.–1999.–Т.33.–№5.–С.866–872.
 74. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие).–М., 1981.–286 с.
 75. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот.–М., 1985.–272 с.
 76. Павлова С. Каталитични антитела// Природа.–1988.–Т.37, N5.–С.60–63.
 77. Пат. С1 ВУ, МПК С12 Q1/34, С12 N9/22. Способ определения ДНКазной активности/ Азаренок К.С., Генералов И.И., Голубева А.Г. и др.–N243A; Заявл. 06.04.1993; Опубл. 14.03.1996.// Афіцыйны бюлетэны/ Дзярж.пат.ведарства Рэсп. Беларусь.–1996.–№3.
 78. Перспективы использования абзимов (каталитических антител) в диагностике СКВ/ Сучков С.В., Козырь А.В., Колесников А.В. и др. // Клин. лаб.диагн.–2000.–N9.–С.8.
 79. Петунина Н.А., Герасимов.Г.А. Аутоиммунный тиреоидит //Проблемы эндокринологии.–1997.–Т.43.–№4.–С.24–27.
 80. Петяев И.М., Кульберг А.Я. Ферментативные свойства антител и клеточных рецепторов //Иммунология.–1988.–№5.–С.12–14.
 81. Поверенный А.М. Почему антитела к ДНК являются показателем аутоиммунного процесса [гипотеза]// Иммунология.–1986.–N 6.–С.86–88.
 82. Поликлональные антитела из крови и спинномозговой жидкости больных рассеянным склерозом эффективно гидролизуют ДНК и РНК/ Барановский А.Г., Канышкова Т.Г., Могельницкий А.С. и др.// Биохимия.–1998.–Т.63, вып.11.–С.1459–1469.
 83. Промышленная иммунология// В мире науки.–1991.–N11.–С.105–106.
 84. Ревматоидный артрит/Под ред. В.А.Насоновой и В.Лайне.–М.: Медицина, 1983, 240 с..
 85. Редакционная колонка//Тер.арх.–1991.–Т.63, N 4.–С.3–4.
 86. Ройт А. Основы иммунологии: пер. с англ./ Под. ред. Р.Г.Василова, А.Ф. Киркина.–М.:Мир.–1991.–С.268–286.

87. Сигидин А.Я. Диффузные болезни соединительной ткани.–М.: Медицина, 1994.–С.
88. Сидорская Е.В., Генералов И.И., Окорочков А.Н. ДНКазная активность препаратов сывороточных IgG при заболеваниях щитовидной железы// Мед. новостей.–2000.–№5.–С.72–74.
89. Сидорская Е.В., Генералов И.И., Окорочков А.Н. Каталитическая активность препаратов IgG при заболеваниях щитовидной железы// Иммунопатология, аллергология, инфектология.–2000.–№1.–С. 57–61.
90. Скачек А.В., Петяев И.М. Достижения микробиологии–практике.–Алма–Ата, 1985.–С.44.
91. Смирнова А.М., Иванова С.П., Лесюис И.Э. Изучение антиферментных иммунологических сдвигов у больных ревматизмом и ревматоидным артритом// Стафилококки и стафилококковые инфекции.–Л., 1968.–С.106–111.
92. СССР, МКИ С 12 Q 1/34. Способ определения гиалуронидазной активности/ Азаренок К.С., Генералов И.И. (СССР)–№ 4866804/13; Заявлено 17.09.90; Опубл. 07.01.93, Бюлл.№1// Изобретения и открытия.–1993.–№1.
93. Станевская А.Т. Консервирование замораживанием применяемой для определения титра антистрептогиалуронидазы гиалуроновой кислоты// Лаб.дело.–1974.–№ 6.–С.374–375.
94. Структура и функции антител/Под ред. Л.Глинна и М. Стюарда.–М.: Мир, 1983.
95. Субстратная специфичность ДНК–и РНК–гидролизующих антител из крови больных полиартритом и аутоиммунным тиреоидитом/ Власов А.В., Барановский А.Г., Канышкова Т.Г. и др. //Молекулярная биология.–1998.–Т.32.–С.559–569.
96. Сулаева Н.И., Леках И.Е., Поверенный А.М. Иммуноглобулины приобретают способность взаимодействовать с ДНК после хроматографии на QAE–сефадексе// Биохимия.–1986.–Т.51, вып.4.–С.574–578.
97. Теппермен Д., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы.–М.: Мир, 1989.–С.317–371.
98. Усиление абзимной активности поликлональных IgG при взаимодействии их с катионами металлов/ Генералов И.И., Сидорская Е.В., Генералова А.Г. и др.// Иммунопатология, аллергология, инфектология.–2000.–№1.–С. 40–43.
99. Ферментативная активность препаратов IgG при вирусных гепатитах. Жильцов И.В., Генералов И.И., Доценко М.Л., Матвеев А.А.// Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.–1998.–№4.–С.73–77.
100. Фильчагин Н.М., Агабабова Э.Р., Назаренко В.М., Чепой В.М. Активность ферментов лизосомального ряда в сыворотке крови и си-

- новияльной жидкости при суставной патологии// Тер.арх.–1977.–N2.–С.120–123.
101. Чурилов Л.П. Стимуляция синтеза РНК, ДНК и митотической активности клеток коркового вещества надпочечников специфическими иммуноглобулинами против ядерных антигенов// Иммунологическая регуляция клеточных функций: Сб. науч. тр./ под ред. Зайчика А.Ш.–Ленингр. педиатр. мед. ин–т.–Л., 1988.–134 с.
 102. Шапот В.С. Нуклеазы.–М.: Медицина, 1968.–162 с.
 103. Шатаева Л.К., Запкина Н.А. О действии на каталазу иммунных и нормальных сывороток// Вопр.мед.хим.–1975.–Т.21, N 3.–С.258–263.
 104. Шлюмберже М., Пачини Ф. Опухоли щитовидной железы.–Paris: Nucleon, 1999.–345 с.
 105. Эшмен Р.Ф. Активация лимфоцитов// Иммунология: Пер с англ./ Под ред. У.Пола.–М.: Мир, 1987.–Т.1.–С.414–469.
 106. A bait and switch hapten strategy generates catalytic antibodies for phosphodiester hydrolysis. Wentworth P.J., Liu Y., Wentworth A.D. et.al// Proc.Natl.Acad.Sci. USA.–1998.–Vol. 95, N11.–P.5971–5975.
 107. A general kinetic approach to investigation of active-site availability in macromolecular catalysts. Resmini M., Gul S., Carter S. et al.// Biochem. J.–2000.–Vol.346, Pt.1.–P.117–125.
 108. A glycosidase antibody elicited against a chair like transition state analog by in vitro immunization. Yu J., Choi S.Y., Moon K.D. et al.// Proc.Natl.Acad.Sci.USA.–1998.–Vol.95, N6.–P.2880–2884.
 109. A monoclonal anti-idiotypic antibody which mimics angiotensin 2 in inducing a population of anti-hormone antibodies. Reilly T.M., Mitchell T.J., Flint S.K., Timmermans P.B.// Hybridoma.–1987.–Vol.6, N 5.–P.461–468.
 110. A new strategy for the generation of catalytic antibodies. Shokat K.M., Leumann C.J., Sugasawara R. et. al.//Nature.–1989.–Vol.338.–P.269–271.
 111. A selenium containing abzyme, the activity of which surpassed the level of native glutathione peroxidase. Luo G., Ding L., Liu Z., et al.// Ann. NY Acad.Sci.–1998.–N864.–P.136–141.
 112. A stereospecific cyclization catalyzed by an antibody. Napper A.D., Benkovic S.J., Tramontano A., Lerner R.A.// Science.–Vol. 237, N 4818.–P.1041–1043.
 113. Adsorption of anti-dsDNA antibodies by immobilized polyanionic compounds. Aotsuka S., Funahashi T., Tani N. et al.// Clin.and Exp.Immunol.–1990.–Vol.79, N 2.–P.215–220.
 114. Afrah H.I., Davidson R.J.L. Mechanism of action of intravenous immunoglobulin in immune-mediated cytopenias// J.Clin.Pathol.–1988.–Vol.41, N12.–P.1249–1255.

115. Ahuja S., Ernst H. Hyperthyroidism and thyroid carcinoma // *Acta Endocrinol. (Copenh).*—1991.—Vol.124.—P.146–151.
116. Al Mashikhi S.A., Li Chan E., Nakai S. Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography// *J.Dairy.Sci.*—1988.—Vol.71, N7.—P.1747–1755.
117. Al-Mashikhi S.A., Nakai S. Separation of immunoglobulin and transferrin from blood serum and plasma by metal chelate interaction chromatography// *J.Dairy.Sci.*—1988.—Vol.71, N7.—P.1756–1763.
118. An antibody catalyzed Claisen rearrangement. D.Y.Jackson, J.W.Jacobs, R. Sugawara et al.// *J.Am.Chem.Soc.*—1988.—Vol.110. P.4841–4842.
119. An unexpectedly efficient catalytic antibody operating by ping-pong and induced fit mechanisms. Wirsching P., Ashley J.A., Benkovic S.J. et al.// *Science.*—1991.—Vol.252, N5006.—P.680–685.
120. Analyses of the molecular forms of serum thyroglobulin from patients with Graves' disease, subacute thyroiditis or differentiated thyroid cancer by velocity sedimentation on sucrose gradient and western-blot. Druetta L., Craizet K., Barnet H. et. al. // *Eur. J. Endocrinol.*—1998.—Vol. 139.—№3.—P.498–507.
121. Analysis of negatively charged dye-binding antibodies reactive with double-stranded DNA and heparan sulfate in serum from patients with rheumatic diseases. Aotsuka S., Okawa-Takatsuji M., Kinoshita M., Yokonary R.// *Clin.Exp.Immunol.*—1988.—Vol.73, N 3.—P.436–442.
122. Antibodies to biologically active molecules/Ed. B.Cinader.—Oxford; London, 1965.
123. Antibody catalysis in reverse micelles. Durfor C.N., Bolin R.J., Sugawara R.J., Massey R.J.// *J.Am.Chem. Soc.*—1988.—Vol.110.—P.8713–8714.
124. Antibody catalysis of a reaction otherwise strongly disfavoured in water. Shabat D., Itzhaky H., Reymond J.L. et al.// *Nature.*—1995.—Vol.374, N6518.—P.143–146.
125. Antibody catalyzed cationic cyclization. Li T., Janda K.D., Ashley J.A., Lerner R.A.// *Science.*—1994, Vol.264, N5163.—P.1289–1293.
126. Antibody remodeling: a general solution to the design of a metal-coordination site in an antibody binding pocket. Roberts V.A., Iverson B.L., Iverson S.A. et. al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.*—1990.—Vol.87.—P.6654–6658.
127. Antibody-catalyzed prodrug activation. Campbell D.A., Gong Bing, Kochersperger L.M. et al.// *J.Am.Chem.Soc.*—1994.—Vol.116.—P.2165–2166.
128. Antibody-combining sites: extending the natural limits. Webster D.M., Pedersen Ya., Staunton D. et al.// *Conf. Catal. Antibodies and Antibody*

- Eng., Moscow, June 6–11, 1993/ *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1994.–Vol.47, N2–3.–P.119–132.
129. Antibody-enhanced hydrolysis of steroid esters. Kohen F., Kim J.-B., Barnard G., Lindner H.R.// *Biochim. Biophys. Acta.*–1980.–Vol.629.–P.328–337.
 130. Anticardiolipin antibodies in autoimmune thyroid diseases. Diez J.J., Doporno R.A., Iglesias P. et. al. // *J. Clin. Lab. Immunol.*–1993.–Vol.40.–№3.–P.125–134.
 131. Anti-idiotypic antibodies as a functional internal images of enzyme- active sites. Friboulet A., Izadyar L., Avasse B. et. al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*–1995.–Vol.750.–P.265–270.
 132. Anti-idiotypic sera against monoclonal anti-progesterone antibodies: production in rabbits and rats and characterization of specificity. Taussig M.J., Brown N., Ellis S. et al.// *Immunology.*–1986.–Vol.58, N3.–P.445–452.
 133. Anti-thyroid peroxidase antibody in patients with autoimmune thyroid disease: possible identity with anti-mitosomal antibody. Portmann L., Hamada N., Heinrich G. et. al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*–1985.–Vol.61.№5.–P.1001–1003.
 134. Are polyclonal catalytic antibodies heterogeneous? Carter S., Resmini M., Simms C. et al.// *Biochem.Soc.Trans.*–1997.–Vol.25, N1.–P. 86S.
 135. Artificial peroxidase like hemoproteins based on antibodies constructed from a specifically designed ortho carboxy substituted tetraarylporphyrin hapten and exhibiting a high affinity for iron porphyrins. Quilez R., de Lauzon S., Desfosses B. et al.// *FEBS Lett.* 1996.–Vol. 395, N1.–P.73–76.
 136. Autoantibodies in Hashimoto disease (lymphadenoid goiter). Roitt J.M., Doniach D., Campbell P.N. et. al. // *Lancet.*–1956.–Vol.2.–P.820.
 137. Autoimmune thyroid disorders in juvenile chronic arthritis and systemic lupus erythematosus. Mihailova D., Grigorova R., Vassileva B. et. al. // *Adv. Exp. Med. Biol.*–1999.–Vol.455.–P.55–60.
 138. Avasse B., Friboulet A., Thomas D. Screening of inhibitory monoclonal antibodies. A critical step for producing anti-idiotypic catalytic antibodies // *Ann.N.Y.Acad.Sci.*–1998.–Vol. 864. P. 118–130.
 139. Avasse B., Thomas D., Friboulet A. Functional mimicry: elicitation of a monoclonal anti-idiotypic antibody hydrolysing b-lactams// *FASEB J.* 1998.–Vol.12.–P.1055–1060.
 140. Avasse B., Zanin V., Thomas D. Antibody catalysis based on functional mimicry // *Appl. Biochem. Biotechnol.*–1998.–Vol. 75.–№1.–P.3–12.
 141. Baker J., Arskott P., Jonson J. An analysis of structure and antigenicity of different forms of human thyroid peroxidase // *Thyroid.*–1994.– Vol.4.–№2.–P.173–178.

142. Baldwin E., Schultz P.G. Generation of catalytic antibody by site-directed mutagenesis// *Science*.–1989.–Vol.245, N 4922.–P.1104–1107.
143. Balkwill F.R., Burke F. The cytokine network // *Immunol. Today*.–1989.–Vol.10.–№9.–P.299–304.
144. Bamberger U., Scheuber P.H., Sailer-Kramer B. et al. Antiidiotypic antibodies that inhibit immediate-type skin reactions in unsensitized monkeys on challenge with staphylococcal enterotoxin// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*.–1986.–Vol.83, N 18.–P.7054–7058.
145. Barbas C.F., Rosenblum J.S., Lerner R.A. Direct selection of antibodies that coordinate metals from semisynthetic combinatorial libraries// *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.–1993.–Vol.90, N14.–P.6385–6389.
146. Baum R. Antibody catalyzes stereospecific reduction// *Chem.Eng. News*.–1992.–Vol.70, N4.–P.33–34.
147. Bencovic S.J. Catalytic antibodies // *Annu. Rev. Biochem*.–1992.–Vol.61.–P.29–54.
148. Bennett Y.C. The infectious etiology of rheumatoid arthritis// *Arth. and Rheum*.–1978.–Vol.21, N 5.–P.531.
149. Berthold U., Steffens U., Northemann W. Human thyroid peroxidase: antibody recognition depends on the natural conformation // *J. Clin. Lab. Anal*.–1993.–Vol.7.–P.401–404.
150. Binding of anti-DNA antibodies to glomerular heparan sulfate: a new clue for the pathogenesis of SLE nephritis? Berden J.H.M., Termaat R.M., Brinkman K. et al.// *Nephrologie*.–1989.–Vol.10, N.3.–P.127–132.
151. Biochemical characterization of selenium containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. Ding L., Liu Z., Zhu Z. et al.// *Biochem. J*.–1998.–Vol.332, Pt.1.–P.251–255.
152. Blecher M. Receptors, antibodies and disease// *Clin. Chem*.–1984.–Vol.30, N7.–P. 1137–1156.
153. Bonanani M., Hanin V. New antigenic clusters on human thyroglobulin defined by an expanded panel of monoclonal antibodies // *Immunology letters*.–1992.–Vol.32.–P.259–264.
154. Bradbury M.G., Parish R. Characterisation of lymphocyte receptors for glycosaminoglycans// *Immunology*.–1991.–Vol.72, N2.–C.231–238.
155. Campbell D.A., Bing Gong, Koshersperger L.M. et al. Antibody catalyzed prodrug activation// *J.Am.Che.Soc*.–1994.–Vol.116.–P.2165–2166.
156. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. Li L., Paul S., Tyutyulkova S., Kazatchkine M.D.// *J.Immunol*.–1995.–Vol.154.–P.3328–3332.
- ✓ 157. Catalytic Antibodies. Blackburn G.M., Datta A., Denham H., Wentworth P.// *Adv.Phys.Org.Chem*.–1998, Vol.31.–P.249–392.

158. Catalytic antibodies/ Ed. Paul S.// Chemical immunology.–Basel: S. Karger AG, 2000.–Vol.77.–162 p.
159. Catalytic hydrolisis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. S. Paul, D.J. Volle, C.M. Beach et. al. //Science.–1989.–Vol.244.–№4909. P.1158–1162.
160. Characterisation of the hydrolytic activity of a polyclonal catalytic antibody preparation by pH-dependence and chemical modification studies: evidence for the involvement of Tyr and Arg side chains as hydrogen-bond donors. Resmini M., Vigna R., Simms C. et al.// Biochem.J.–1997, Vol.326.–P.279–287.
161. Characterization of autoantibodies to vasoactive intestinal peptide in asthma. S. Paul, S. I. Said, A. B. Thompson et. al. //J.Immunol.–1989.–Vol.23.–№2.–P.133–142.
162. Characterization of thyroglobulin-directed and polyreactive catalitic antibodies in autoimmune disease. S. Paul, R. Kalaga, J. O'Dell et. al. // J. Immunol.–1997.–Vol.3.–№159.–P.1530–1536.
163. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. H. Mobley, M. Cortesia, L. Rosenthal, B. Jones// J.Clin.Microbiol.–1988.–Vol.26.–P. 831–836.
164. Charbonnier J.B., Golinelli-Pimpaneau B., Gigant B. et al. Structural convergence in the active sites of a family of catalytic antibodies// Science.–1997.–Vol.275, N5303.–P.1140–1142.
165. Cicardi M., Bisiani G., Cugno M., et al. Autoimmune C1 inhibitor deficiency: report of eight patients// Am.J. Med.–1993.–Vol.95, N2.–P.169–175.
166. Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab fragment: application of the flow linear dichroism technique. G.V.Gololobov, E.A.Chernova, D.V.Schourov et. al. //Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–1995.–Vol.92.–P.254–257.
167. Cochran A.G., Schultz P.G. Antibody-catalyzed porphyrin metallation// Science.–1990.–Vol.249, N 4895.–P.781–783.
168. Complement-independent lysis of human red blood cells by cold hemagglutinins. Salama I., Gottsche B., Vaidya V. et al. //Vox Sang.–1988.–Vol.55.–P.21–25.
169. Control of the exo and endo pathways of the Diels–Alder reaction by antibody catalysis. Gouverneur V.E., Houk K.N., de-Pascual–Teresa B. et al.// Science.–1993.–Vol.262, N5131.–P.204–208.
170. Cross-reactivity between *Streptococcus* and human tissue: a model of molecular mimicry and autoimmunity. Froude J., Gibofsky A., Buskirk D.R. et al.// Mol. Mimicry.–Berlin etc., 1989.–P.5–26.
171. Crossreactivity of anti-DNA antibodies with proteoglycans. Faaber P.,

- Capel P.G.A., Rijke G.P.M. et al. - Clin. Exp. Immunol. - 1984. - Vol. 55. - P. 502-508.
172. Davies R.D., Padlan et al. Antibody-antigen complexes// Ann. Rev. Biochem. - 1990. - Vol. 59. - P. 439-473.
 173. Delpech B., Bertrand P., Chaury C. An indirect enzymeimmunoassay for hyaluronidase// J. Immunol. Meth. - 1987. - Vol. 104, N 1-2. - P. 223-229.
 174. Design of catalytic antibodies for carbohydrate synthesis. Dong Wenling, Jespersen T.M., Bols N. et al. / J. Cell. Biochem. - 1994. - Suppl. 18. - P. 194.
 175. DNA hydrolysis by monoclonal anti ssDNA autoantibody BV 04 01: origins of catalytic activity. Gololobov G.V., Rumbley C.A., Rumbley J.N. et al. // Mol. Immunol. - 1997. - Vol. 34, N 15. - P. 1083-1093.
 176. DNA-hydrolysing autoantibodies. A.G. Gabibov, G.V. Gololobov, O.I. Makarevich et. al. // Appl. Biochem. Biotechnol. - 1994. - Vol. 47. - № 2-3. - P. 293-302.
 177. DNA-hydrolyzing autoantibodies. A. M. Shuster, G.V. Gololobov, O.A. Kvashuk et. al. // Science. - 1992. - Vol. 256. - P. 665-667.
 178. DNase-hydrolyzing autoantibodies in autoimmune pathologies. D.V. Schourov, G.V. Gololobov, O.I. Makarevich et. al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1995. - Vol. 750. - P. 255-264.
 179. Dugas H. Bioorganic chemistry. A chemical approach to enzyme action - 2nd Ed. - NY etc.: Springer-Verlag, 1989. - P. 116.
 180. Dugas H. Bioorganic chemistry. A chemical approach to enzyme action - 2nd Ed. - NY etc.: Springer-Verlag, 1989. - P. 496.
 181. Dynamic relationship between hydrolytic enzymes and the immune system in rheumatic diseases. Wada T., Aoyagi T., Kojima F. et al. // J. Clin. Biochem. Nutr. - 1987. - Vol. 2, N 1. - P. 71-81.
 182. Enzymatic functional groups provide nucleophilic and electrophilic catalysts// Zubay G. Biochemistry. - Dubuque etc.: Wm.C. Brown Communications, Inc., 1993. - P. 222-223.
 183. Epitopes on thyroglobulin: a study of patients with thyroid disease. P. Caturegli, S. Mariotti, R.C. Kupperts et. al. // Autoimmunity. - 1994. - Vol. 18. - № 1. - P. 41-49.
 184. Erhan S., Greller L.D. Do immunoglobulins have proteolytic activity?// Nature. - 1974. - Vol. 251. - P. 353.
 185. Erlanger B.F. Some thoughts on the structural basis of internal imagery/ / Immunol. Today. - 1989. - Vol. 10, N 5. - P. 151-152.
 186. Evans H.B., Phua K.K., Johnson P.M. Anti-peptidoglycan serology in patient sera and experimental production of anti-peptidoglycan antibody by immunisation with rheumatoid factor// Biol. Prop. Peptidoglycan. Proc. 2 Int. Workshop, Munich, May 20-21, 1985. - Berlin, NY, 1986. - P. 89-93.

187. Evolution of catalytic activity throughout a polyclonal immune response elicited by a transition-state-analog hapten. Shreder K., Thomas R., Wallace M. et al.// *Isr.J.Chem.*–1996.–Vol.36.–P.215–220.
188. Evolution of shape complementarity and catalytic efficiency from a primordial antibody template. Xu J., Deng Q., Chen J. et al.// *Science.*–1999.–Vol.286, N5448.–P.–2345–2348
189. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase I-deficient mice. Napirei M., Karsunky H., Zevnik B. et al.// *Nature Genetics.*–2000.–Vol.25, N2.–P.177–181.
190. Flint H.M., McCarty M., Blake M. Induction of antibodies to hyaluronic acid by immunization of rabbits with encapsulated streptococci// *J.Exp.Med.*–1986.–Vol. 164.–P.762–776.
191. Frackelton R., Rotman B. Functional diversity of antibodies elicited by bacterial beta-D-galactosidase.–*J. Biol.Chem.*–1980.–Vol.256, N 11.–P.5286–5290.
192. Fraser C.M., Venter J.C. Anti-receptor antibodies in human disease // *J. Allergy. Clin. Immunol.*–1984.–Vol.74.–№5.–P.661–673.
193. Fraser C.M., Venter J.C. Autoantibodies to beta-adrenergic receptors and asthma// *J.Allergy and Clin. Immunol.*–1984.–Vol. 74, N 3, Pt 1.–P.227.–229.
194. Gallacher G., Jackson C.S., Searcey M. et al. Catalytic antibody activity elicited by active immunisation. Evidence for natural variation involving preferential stabilization of the transition state// *Eur.J. Biochem.*–1993.–Vol.214, N1.–P.197–207.
195. Generalov I.I., Sydorskaya E.V. Abzyme activity in systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA)// *Immunol. Lett.*–1997.–Vol.56, №1–3–P.309.
196. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. Huse D.W., Sastry L., Iverson S.A. et al.// *Science.* 1989. V.246. P.1275.
197. Generation of monoclonal anti-dermatan sulphate antibodies cross-reacting to calf thymus DNA. Ohnishi K., Sagava A., Nakabayashi T. et al.// *Clin.exp.Immunol.*–1989.–Vol.75, N 1.–P.118–122.
198. Gigant B., Tsumuraya T., Fujii I., Knossow M. Diverse structural solutions to catalysis in a family of antibodies// *Structure Fold.Des.*–1999.–Vol.7, N11.–P.1385–1393.
199. Gololobov G., Sun M., Paul S. Innate antibody catalysis// *Mol.Immunol.*–1999.–Vol.36, N18.–P.1215–1222.
200. Hale J.E., Beidler D.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. *Anal.Biochem.*–1994.–Vol.222, N1.–P. 29–33.

201. Helms E.D. Investigations of polyclonal catalytic antibodies: Ph.D. dissertation. Department of Chemistry and Biochemistry, The University of Texas, Austin, USA.—1997.
202. Hirschmann R., Smith A.B., Taylor C.M. et al.. Peptide synthesis catalyzed by an antibody containing a binding site for variable amino acids// *Science*.—1994. Vol.265, N5169.—P.234–237.
203. Hoie S., Fossum K. Antibodies to staphylococcal DNases in sera from different animal species, including humans// *J. Clin. Microbiol.*—1989.—Vol.27, N11.—P.2444–2417.
204. Hollfelder F., Kirby A.J., Tawfik D.S. Off-the-shelf proteins that rival tailor-made antibodies as catalysts// *Nature*.—1996.—Vol.383, N6595.—P.60–62.
205. Homogeneous enzyme immunoassay for thyroxine. Ullman E.F., Blakemore J., Leute R.K. et al.// *Clin.Chem.*—1975.—Vol.21, N7.—P.1011.
206. Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope. Barbas C.F., Heine A., Zhong G. et al.// *Science*.—1997.—Vol.278, N5346.—P.2085–2092.
207. Immunochemical studies of polyspecific natural autoantibodies: charge, lipid reactivity, Fab' fragments activity and complement fixation. Poncet P., Matthes T., Billecoco A., Dighiero G. // *Mol.Immunol.*—1988.—Vol.25, N 10.—P.981–989.
208. Immunoglobulin isotype response to the group A streptococcal carbohydrate in humans. Araj G.F., Majeed H.A., Yousof A.M., Ayoub E.M.// *APMIS Suppl.*—1988.—Vol.96, N 3.—P.8–12.
209. Incidence of antibodies to native and denaturated cartilage collagens (types 2, 9, and 11) and to type I collagen in rheumathoid arthritis. Morgan K., Clague R.B., Collins I. et al.// *Ann. Rheum.Diseases*.—1987.—Vol.46, N 12.—P.902–907.
210. Induction of an antibody that catalyzes the hydrolysis of an amide bond. Janda K.D., Schloeder D., Benkovic S.J., Lerner R.A.// *Science*.—1988.—Vol.241, N 4870.—P. 1188–1191.
211. Insulin receptor monoclonal antibodies that mimic insulin action without activating tyrosine kinase. Hawley D.M., Maddux B.A., Patel R. et al.// *J.Biol.Chem.*—1989.—Vol.264, N 5.—P.2438–2444.
212. Iverson B.L., Lerner R.A. Sequence-specific peptide cleavage catalyzed by an antibody// *Science*.—1989.—Vol.243, N4895.—P.1184–1188.
213. Janda K.D. Catalytic antibodies: the rerouting of chemical reactions// *Biochem.Soc.Trans.*—1993.—Vol.21, N4.—P. 1090–1095.
214. Janda K.D., Benkovic S.J., Lerner R.A. Catalytic antibodies with lipase activity and R or S substrate selectivity// *Science*.—1989.—Vol.244, N4903.—P. 437–440.

215. Janda K.D., Shevlin C.G., Lerner R.A. Antibody catalysis of a disfavored chemical transformation// *Science*.–1993.–Vol.259, N5094.–P.469–470.
216. Jenks W.P. Binding energy, specificity and enzymic catalysis–the circe effect // *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* / Ed. Meister A.–NY etc., 1975. Vol. 43.–P. 219–411.
217. Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system // *Ann. Immunol. Paris*.–1974.–Vol.125.–№1–2.–P.373–389.
218. Johnson G., Moore S.W. Anti-acetylcholinesterase antibodies display cholinesterase-like activity//*Eur. J. Immunol.*–1995.–Vol.25.–№1.–P.25–29.
219. Karlstrom A., Zhong G., Rader C. et al. Using antibody catalysis to study the outcome of multiple evolutionary trials of a chemical task// *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*.–2000.–Vol.97, N8.–P.3878–3883.
220. Kinetic characterization of antibody catalyzed insertion of a metal ion into porphyrin. Kawamura Konishi Y., Hosomi N., Neya S. et al.// *J. Biochem. Tokyo*.–1996.–Vol.119, N5.–P.857–862
221. Kirby A.J., Hollfelder F., Tawfik D.S. Nonspecific catalysis by protein surfaces// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–2000.–Vol.83, N1–3.–P.173–180.
222. Kit Yu.Yu., Semenov D.V., Nevinsky G.A. Phosphorylation of different human milk proteins by human secretory immunoglobulin A // *Bioch. Mol. Biol. Int.*–1996.–Vol.39.–P.521–527.
223. Klippel J.H., Decker J.L. Systemic lupus erythematosus // *Internal Medicine*.–1987.–Boston, Toronto.–P.1270–1278.
224. Knobel M., Barka M. Prevalence of antithyroid peroxidase antibodies in autoimmune and nonautoimmune thyroid disorders // *J. Endocrinol. Invest.*–1994.–Vol.17.–№11.–P.837–842.
225. Kozyr A.V., Kolesnikov A.V., Zelenova N.A et al. Autoantibodies to nuclear antigens: correlation between cytotoxicity and DNA–hydrolyzing activity// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–2000.–Vol.83, N1–3.–P.255–268.
226. Labile disulfide bonds and free thiol groups in human IgG. I. Assignment to IgG1 and IgG2 subclasses. Shuanenstein E., Dachs F., Reiter M. et al.// *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*–1986.–Vol.80, N2.–P.174–179.
227. Lacroix–Desmazes S., Moreau A., Sooryanarayana. et al. Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A// *Nat. Med.*–1999.–Vol.5, N9. P.1044–1047.
228. Landry D.W. Immunotherapy for cocaine addiction// *Sci.Am.*–1997.–Vol.276, N2.–P.42–45.
229. Landry D.W., Yang G.X. Anti-cocaine catalytic antibodies – a novel approach to the problem of addiction// *J.Addict.Dis.*–1997.–Vol.16, N3.–P.1–17.
230. Larrick J.W., Gavilondo J. Therapeutic antibody technology 97. *Immunotechnol.*–1998.–Vol.3, N4.–P.303–307.

231. Lerner R.A., Barbas C.F. Using the process of reactive immunization to induce catalytic antibodies with complex mechanisms: aldolases// *Acta Chem. Scand.*–1996.–Vol.50, N8.–P.672–678.
232. Lerner R.A., Benkovic S.J. Observations in the interface between immunology and chemistry// *Chemfracts–Org.Chem.*–1990.–Vol.3, N1.–P. 1–36.
233. Lerner R.A., Benkovic S.I., Schultz P.J. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies // *Science.*–1991.–Vol.252.–P.659–667.
234. Lerner R.A., Janda K.D. Catalytic antibodies: evolution of protein function in real time// *EXS.*–1995.–Vol.73.–P.121–38.
235. Marx E.J. Making antibodies work like enzymes// *Science.*–Vol.234, N 4783.–P.1497–1498.
236. Matsuura K., Ikoma S., Sugiyama M. et al. Amidase and peptidase activities of polyclonal immunoglobulin G present in the sera of patients with rheumatoid arthritis// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–2000.–Vol.83, N1–3, P.107–113.
237. Mechanistically different catalytic antibodies obtained from immunization with a single transition–state analog. Guo J., Huang W., Zhou G.W. et al. // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*–1995.–Vol.92, N5.–P.1694–1698.
238. Merrill C.R., Goldman D., Sedman S.A. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins// *Science.*–1981.–Vol. 211, N 4489.–P. 1437–1438.
239. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.// *Nature.*–1975.–Vol.258.–P.598–599.
240. Metal cofactors// Zubay G. *Biochemistry.*–Dubuque etc.: Wm.C.Brown Communications, Inc., 1993.–P.300–301.
241. Metalloantibodies. B.L. Iverson, S.A. Iverson, V.A. Roberts et. al. // *Science.*–1990.–Vol.249.–P.659–662.
242. Molecular cloning of a proteolytic antibody light chain. Q.S. Gao, M. Sun, S. Tyutyulkova et. al. // *J. Biol. Chem.*–1994.–Vol.269.–№51.–P.32389–32393.
243. Monoclonal antibodies against palladium (II) coproporphyrin: hapten binding and peroxidase catalytic activity of complexes with iron (III) coproporphyrin/ Demcheva M.V., Nelen M.I., Deiko S.A. et al.// *11th Eur.Immunol. Soc.–Helsinki*, 1991.–P.10.
244. Multifunctional antigens of *A. fumigatus* and specific antibodies/ Purkayastha S., Madan T., Shah A. et al.// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–2000.–Vol.83, №1–3.–P.271–283.
245. Naparstek Ya. Autoantibodies and the normal preimmune repertoire// *Israel J.Med.Sci.*–1988.–Vol.24, N7.–P.370–373.

246. Napper A.D., Benkovic S.J., Tramontano A. A stereospecific cyclization catalyzed by an antibody// *Science*.–1987.–Vol.237, N4818.–P. 1041–1043.
247. Natural catalytic antibodies: peptide–hydrolyzing activities of Bence–Jones proteins and VL fragments. S.Paul, L.Li, R.Kalaga et. al.// *J. Biol. Chem.*–1995.–Vol.270.–P.15257–15261.
248. Nedonchelle E., Pitiot O., Vijayalakshmi M.A. A preliminary study for isolation of catalytic antibodies by histidine ligand affinity chromatography as an alternative to conventional protein A/G methods// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–2000.–Vol.83, N1–3.–P.287–294.
249. Nilsson B., Nilsson U.R. Anti–idiotypic antibodies in antisera against human C3 and factor H and their application in the enrichment of antibodies specific for H–binding domains of C3// *J. Immunol.*–1987.–Vol.138, N 6.–P.1858–1863.
250. Novel functional activities of anti–DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases. A.V. Kozyr, A.V. Kolesnikov, E.S. Aleksandrova et al.// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–1998.–Vol.75.–№1.–P.45–61.
251. Odenbaugh A.L., Helms E.D., Iverson B.L. An investigation of antibody acyl hydrolysis catalysis using a large set of related haptens// *Bioorg.Med.Chem.*–2000.–Vol.8, N2.–P.413–426.
252. On roads not taken in the evolution of protein catalysts: antibody steroid isomerases that use an enamine mechanism. Lin C.H., Hoffman T.Z., Wirsching P. et al.// *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*–1997.–Vol.94, N 22.–P.–11773–11776.
253. Pat. 2270695 Great Britain, MCI C12P 21/08 C07 K 13/00. Anti–idiotypic antibodies that activate plasminogen/ Cederholm–Williams Stewart A.; Oxford research support Co. Ltd.–N9219826; Заявл. 18.09.92; Опубл. 23.03.9.
254. Pat.4659567 USA, MCI C07 D 209/48. Molecules with antibody combining sites that bind to hydrolytic transition states./A. Tramontano, R.Lerner (USA).–N648406; 07.09.84.; publ.07.05.87.
255. Paul S. A new effector mechanism for antibodies: catalytic cleavage of peptide bonds//*Cold. Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.*–Vol.54.–Pt.1.–Cold Spring Harbor (N.Y.).–1989.–P.283–286.
256. Paul S. Mechanism and functional role of antibody catalysis// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–1998.–Vol.75, N1.–P.13–24.
257. Paul S. Natural catalytic antibodies// *Mol.Biotechnol.*–1996.–Vol.5, N3.–P. 197–207.
258. Paul S., Gabibov A., Massey R. Catalytic antibodies. Conference overview// *Mol.Biotechnol.*–1994.–Vol.1, N1.–P.109–111.
259. Paul S., Kalaga R.S., Gololobov G., Brennenman D. Natural catalytic

- immunity is not restricted to autoantigenic substrates: identification of a human immunodeficiency virus gp120 cleaving antibody light chain// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–2000.–Vol.83, N1–3.–P.71–82.
260. Paul S., Volle D.J., Mei S. Affinity chromatography of catalytic autoantibody to vasoactive intestinal peptide// *J. Immunol.*–1990.–Vol.145.–P. 1196–1199.
 261. Persidis A. Catalytic antibodies. Some companies are taking an active interest in this promising technology // *Nat.Biotechnol.*–1997.–Vol.15, N 12.–P.1313–1315.
 262. pH–gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A–sepharose. Duhamel C.R., Schur P.H., Brendel K., Meezan E.// *J.Immunol.Meth.*–1979.–Vol.31.–P.211–217.
 263. Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G. Selective chemical catalysis by an antibody// *Science.*–1986.–Vol.234, N 4783.–P.1570–1573.
 264. Pollack S.J., Nakayama G.R., Schultz P. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites// *Science.*–1988.–Vol.242.–P.1038–1040.
 265. Polyclonal antibody catalytic variability. D.B. Stephens, R.E. Thomas, J.F. Stanton, B.L. Iverson// *Biochem J.*–1998, Vol.332, Pt.1.–P. 127–134.
 266. Prodrug activation via catalytic antibodies. Miyashita H., Karaki Y., Kikuchi M., Fujii I.// *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.*–1993.–Vol.90.–P.5337–5340.
 267. Protein A vs G: which is better?// *Bioeng. News.*–1987.–Vol.8, N21.–P.1–2.
 268. Protein engineering of antibody combining sites: introduction of catalytic activity. Hilyard K.L., Sally R., Cheetham J.C., Rees A.R. // *J.Cell.Biochem.*–1989.–Suppl.13A.–P.86.
 269. Purification of bacterially expressed single chain Fv antibodies for clinical applications using metal chelate chromatography. Casey J.L., Keep P.A., Chester K.A.et al.// *J.Immunol.Meth.*–1995.–Vol.179, N1.–P.105–116.
 270. Quantitative aspects of silver deposition in proteins resolved in complex polyacrylamide gels. Guevara J., Jonhston D.A., Ramagali L.S. et al.// *Electrophoresis.*–1982.–N3.–P.197–205.
 271. Radulescu R.T. Antibody constant region: potential to bind metal and nucleic acid// *Med.Hypotheses.*–1995.–Vol.44, N2.–P.139–145.
 272. Raso V., Stollar B.D. The antibody–enzyme analogy. Characterisation of antibodies to phosphopyridoxyltyrosine derivatives // *Biochemistry.*–1975.–Vol.14.–№3.–P.584–591.
 273. Raso V., Stollar B.D. The antibody–enzyme analogy. Comparison of enzymes and antibodies specific for phosphopyridoxyltyrosine// *Ibid.*–1975.–Vol.14, N 3.–P.591–599.

274. Rassi El Z., Horvath C. Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminodiacetic acid-bonded stationary phases on silica support// *J.Chromatogr.*–1986.–Vol.359.–P.241–253.
275. Recognition of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄ by rabbit anti-idiotypic antibodies to a mouse monoclonal antileukotriene B₄. Gifford L.A., Chernov–Rogan T., Harvey J.P. et al.// *J.Immunol.*–1987.–Vol.138, N 4.–P.1184–1189.
276. Roberts V.A., Getzoff E.D. Metalloantibody design// *FASEB J.*–1995.–Vol.9, N1.–P.94–100.
277. Rodkey L.S., Gololobov G., Rumbley C.A. et al. DNA hydrolysis by monoclonal autoantibody BV 04–01// *Appl. Biochem. Biotechnol.*–2000.–Vol.83, N1–3.–P.95–103.
278. Romesberg F.E., Spiller B., Schultz P.G., Stevens R.C. Immunological origins of binding and catalysis in a Diels–Alderase antibody// *Science.*–1998.–Vol.279, N5358.–P.1929–1933.
279. Roux C.T., Tankersley D.L. A view of the human idiotypic repertoire. Electron microscopic and immunologic analysis of spontaneous idiotype–anti–idiotype dimers in pooled human IgG// *J. Immunol.*–1990.–Vol.144, N 4.–P. 1387–1395.
280. Ruf J., Feldt–Rasmussen U., Hegedus L. Bispecific thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibodies in patients with various thyroid and autoimmune diseases// *J. Clin. Endocrinol. Metab.*–1994.–Vol.79.–№5.–P.1404–1409.
281. Ruf J., Ferrand M., Durand–Gorde J.M. Autoantibodies and monoclonal antibodies directed to an immunodominant antigenic region of thyroglobulin interact with thyroperoxidase through an interspecies idiotype// *Autoimmunity.*–1994.–Vol.19.–№1.–P.55–62.
282. Schultz P.G. The interplay between chemistry and biology in the design of enzymatic catalysts// *Science.*–1988.–Vol.240, N4851.–P. 426–433.
283. Schultz P.G., Lerner R.A., Benkovic S.J. Catalytic antibodies// *Chem.Eng.News.*–1990.–Vol.68, N22.–P. 26–40.
284. Schultz P.G., Lerner R.A. From molecular diversity to catalysis: lessons from the immune system // *Science.*–1995.–Vol.269.–P.1835–1844.
285. Sen S.E., Hannemann D.E. Catalytic antibodies as triketone herbicide–degrading agents// 218th ACS National Meeting.–New Orleans, 1999.
286. Serine proteases are a diverse group of enzymes that use a serine residue for nucleophilic catalysis// Zubay G. *Biochemistry.*–Dubuque etc.: Wm.C.Brown Communications, Inc., 1993.–P.225–230.
287. Shokat K.M., Schultz P.G. Catalytic antibodies// *Annu. Rev. Immunol.*–1990.–Vol.8.–P. 335–363.
288. Sinha C.S., Keinan E. Catalytic antibodies in organic synthesis.

- Asymmetric synthesis of (-)- α -multistriatin// *J. Am. Chem. Soc.*—1995.—Vol. 117.—P. 3653–3654
289. Sinohara H., Matsuura K. Does catalytic activity of Bence–Jones proteins contribute to the pathogenesis of multiple myeloma?// *Appl. Biochem. Biotechnol.*—2000.—Vol. 83.—N 1–3.—P. 85–92.
 290. Site directed mutagenesis of active site contact residues in a hydrolytic abzyme: evidence for an essential histidine involved in transition state stabilization. Miyashita H., Hara T., Tanimura R. et al.// *J. Mol. Biol.*—1997.—Vol. 267, N 5.—P. 1247–1257
 291. Slobin I.I. Preparation and some properties of antibodies with specificity toward p-nitrophenyl esters// *Biochemistry.*—1966.—Vol. 5, N 9.—P. 2836–2844.
 292. Smith R.M., Yuan P., Weiner D.P. c oabт. An approach to sequence-specific antibody proteases. The use of haptens mimicking both a transition state and a distorted ground state// *Appl. Biochem. Biotechnol.*—1994.—Vol. 47, N 2–3.—P. 329–342.
 293. Smithrud D.B., Benkovic P.A., Benkovic S.J. et al. Cyclic peptide formation catalyzed by an antibody ligase// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*—2000.—Vol. 97, N 5.—P. 1953–1958.
 294. Some Bence–Jones proteins enter cultured renal tubular cells, reach nuclei and induce cell death. Matsuura K., Ikoma S., Watanabe M. et al.// *Immunology.*—1999.—Vol. 98, N 4.—P. 584–589.
 295. Specific protein-binding reactions monitored by enzymatic hydrolysis of ligand–fluorescent dye conjugates. J.F. Burd, R.J. Carrico, M.C. Fetter et al. // *Anal. Biochem.* 1977.—Vol. 77.—№1.—P. 56–67.
 296. Stephens D.B., Iverson B.L. Catalytic polyclonal antibodies// *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—1993.—Vol. 192.—P. 1439–1444.
 297. Stephens D.B., Wilmore B.H., Iverson B.L. Polyclonal antibodies and catalysis// *Bioorgan. Med. Chem.*—1994.—Vol. 2.—P. 1–6.
 298. Structural convergence in the active sites of a family of catalytic antibodies. Charbonnier J.B., Golinelli Pimpaneau B., Gigant B. et al.// *Science.*—1997.—Vol. 275, N 5303.—P. 1140–1142.
 299. Study of abzymes with cytochrome P 450 catalytic activity. Liu X., Chen S., Feng Y. et al.// *Ann. NY Acad. Sci.*—1998.—N 864.—P. 273–275.
 300. Suh J., Oh S. Remarkable proteolytic activity of imidazoles attached to cross-linked polystyrene// *J. Org. Chem.*—2000.—Vol. 65, N 22.—P. 7534–7540.
 301. Tawfik D.S., Eshhar Z., Green B.S. Catalytic antibodies: a critical assessment// *Mol. Biotechnol.*—1994.—Vol. 1, N 1.—P. 87–103.
 302. The effect of myasthenic syndrome antibody on presynaptic calcium channels in the mouse. Lang B., Newsom–Davis J., Peers C. et al.// *J. Physiol.*—1987.—Vol. 390.—P. 257–270.

303. The enzymic nature of antibody catalysis: development of multistep kinetic processing. S.J. Benkovic, J.A. Adams, C.L. Borders et. al. //Science.–1990.–Vol.250.–P.1135–1139.
304. The presence and significance of some anty-enzyme antibodies (anti-plasminogen, antitrypsin, anti-phospholipase C) in rheumathoid arthritis (RA) and reactive arthritis (rA). Stefanescu M., Szegly G., Cremer L. et al.// Arch. raum. pathol. exp. et microbiol.–1989.–Vol.48, N 1.–P.47–53.
305. The pyridoxal 5' phosphate dependent catalytic antibody 15A9: its efficiency and stereospecificity in catalysing the exchange of the alpha protons of glycine. Mahon M.M., Gramatikova S.I., Christen P. et al.// FEBS Lett.–1998.–Vol.427, N1.–P.74–78.
306. Thiagarajan P., Dannenbring R., Matsuura K. et al. Monoclonal antibody light chain with prothrombinase activity// Biochemistry.–2000.–Vol.39, N21.–P.6459–6465.
307. Toward antibody-directed “abzyme” prodrug therapy, ADAPT: carbamate prodrug activation by a catalytic antibody and its in vitro application to human tumor cell killing. Wentworth P., Datta A. Blakey D. et al.// Proc.Natl.Acad.Sci.USA.–1996.–Vol.93, N2.–P.799–803.
308. Tramontano A., Janda K.D., Lerner R.A. Catalytic antibodies// Science.–1986.–Vol.234, N 4783.–P.1566–1570.
309. TSK–gel Toyopearl HW. Packing manual.–Tokyo, 1982.
310. Turner J.M., Bui T., Lerner R.A. et al. An efficient benchtop system for multigram–scale kinetic resolutions using aldolase antibodies// Chemistry.–2000.–Vol.6, N15.–P.2772–2774.
311. Ulrich H.D., Schultz P.G. Analysis of hapten binding and catalytic determinants in a family of catalytic antibodies// J.Mol.Biol.–1998.–Vol.275, N1.–P.95–111.
312. Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis. R. Kalaga, L.Li, J.R.O'Dell et. al. //J.Immunol.–1995.–Vol.155.–№5.–P.2695–2702.
313. Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MRL/lpr and SJL mice immunized with a transition–state analog: is there a linkage to autoimmunity? Tawfik D.S., Chap R., Green B.S. et al.// Proc.Natl.Acad.Sci.USA.–1995.–Vol.92, N6.–P.2145–2149.
314. Unique pattern of cleavage of vasoactive intestinal peptide by human lymphocytes. Goetzl E.G., Kodama K.T., Turck C.W., Schiogolev S.A. // Immunology.–1989.–Vol.66, N4.–P.554–558.
315. Using antibodies to perturb the coordination sphere of a transition metal complex. Ghosh P., Shabat D., Kumar S. et al.// Nature.–1996.–N382.–P.339–341.

316. Vayron P., Renard P.Y., Taran F. et al. Toward antibody-catalyzed hydrolysis of organophosphorus poisons// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-2000.-Vol.97, N13.-P.7058-7063.
317. Volpe R. Autoimmune disease of the endocrine system.-New York.-1990.-P.150-154.
318. Weiner D.P. Catalytic antibodies// Chem. and Ind.-1991.-N10.-C.347-349.
319. Wirsching P., Ashley J.A., Lo C.H. et al. Reactive immunization// Science.-1995.-Vol.270, N5243.-P.1775-1782.
320. Xiang X.-D., Xiaodong Sun, Briceno G. et al. A combinatorial approach to materials discovery// Science.-1995.-Vol.268.-P.1739-1740.
321. Yang J., Merritt K. Detection of antibodies against corrosion products in patients after Co-Cr total joint replacements. J.Biomed.Mater.Res.-1994.-Vol.28, N11.-P.1249-1258.
322. Yap Peng Lee. Intravenous immunoglobulin for secondary immunodeficiency// Blut.-1990.-Vol.60, N1.-P.8-14.
323. Zhyltsov I.V., Generalov I.I. Interaction of human IgG with different metal cations// Immunol.Lett.-1997.-Vol.56, №1-3.-P.309.
324. Zinc provides an electrophilic center in some proteases// Zubay G. Biochemistry.-Dubuque etc. Wm.C.Brown Communications, Inc., 1993.-P.231-234.
325. Zouali M., Hansen D.E. Antibodies - no longer just for binding //Trends. Biotechnol.-1994.-Vol.12.-№3.-P.73-74.



Научное издание

АБЗИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Генералов Игорь Иванович

Ответственные за выпуск:
проректор по учебной работе ВГМУ профессор М.А.Никольский;
директор РИПЦ И.А.Борисов.

Сдано в набор 29.10.2000. Подписано в печать 18.12.2000 года.
Формат 64*84, 1/16. Бумага типографская №2. Печатных листов – 9, 19.
Тираж 500 экз. Заказ №277.

Художник А.Г. Генералова
Верстка Т.П. Грессель

Издательство Витебского государственного медицинского университета.
210602, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27. Лицензия ЛВ № 91 от 22.12.97 г.

Отпечатано на ризографе в Витебском государственном
медицинском университете.
210602, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27. Лицензия ЛП № 326 от 05.01.99 г.